



Synthèse chimioenzymatique et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues de la valioline

Lahssen El Bli

► To cite this version:

Lahssen El Bli. Synthèse chimioenzymatique et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues de la valioline. Chimie analytique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : 2006CLF21692 . tel-00707646

HAL Id: tel-00707646

<https://theses.hal.science/tel-00707646>

Submitted on 13 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Numéro d'ordre : D.U. 1692

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° : 501

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(*Spécialité* : CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE)

PAR

Lahssen EL BLIDI

Diplômé d'Etudes Approfondies de Chimie de Clermont-Ferrand II

**SYNTHESE CHIMIOENZYMATIQUE ET
EVALUATION
D'INHIBITEURS POTENTIELS DE GLYCOSIDASES,
ANALOGUES DE LA VALIOLAMINE**

Soutenue le 16 novembre 2006 devant la commission d'examen :

Président :	J. BOLTE, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II
Rapporteurs :	O. MARTIN, Professeur à l'Université d'Orléans C. AUGÉ, Directeur de recherche CNRS à l'Université Paris-Sud, Paris XI
Examineurs :	M. LEMAIRE, Maître de conférences à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II C. NUGIER-CHAUVIN, Maître de conférences à l'ENSC de Rennes C. TAILLEFUMIER, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II

*Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (S.E.E.S.I.B.), UMR 6504 du CNRS de Clermont-Ferrand. Je tiens à remercier le Professeur **Jean Bolte**, responsable de ce laboratoire, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury lors de ma soutenance de thèse.*

*J'aimerais remercier sincèrement Madame **Marielle Lemaire**, Maître de conférences, mon directeur de thèse pour la qualité de son encadrement. Ses conseils, sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse et sa rigueur scientifique m'ont été d'une aide précieuse. Merci encore, Marielle et je te souhaite bonne chance sur la route des inhibiteurs de glycosidases.*

*Je remercie aussi tous les membres du jury : Monsieur **Olivier Martin**, Professeur à l'Université d'Orléans et Madame **Claudine Augé**, Directeur de recherche CNRS à l'Université Paris Sud, Paris IX, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Monsieur **Claude Taillefumier**, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand et Madame **Caroline Nugier-Chauvin**, Maître de conférences à l'ENSC de Rennes, d'avoir accepté de participer à ce jury.*

*Je remercie vivement, Monsieur **Thierry Gefflaut**, Maître de conférences et **Franck Charmantray**, chargé de recherche au CNRS, pour leur aide, leurs conseils, les discussions fructueuses et leur disponibilité.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **Mustapha Ahbala**, Professeur à l'Université Chouaib Doukkali d'El Jadida, Maroc, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir co-dirigé mes travaux de thèse.*

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de l'équipe Bioconversions pour leurs encouragements, leur soutien et la sympathie qu'ils m'ont témoignés, et en particulier mes collègues de paillasse : Emmanuelle, Estelle, Henri, Joël.

Merci beaucoup à Gaëlle, Marjorie, Séverine et Aurélien pour leur participation à ce travail.

Je voudrais également remercier l'ensemble du laboratoire SEESIB et surtout mes collègues étudiants présents : Fadoua, Elisabeth, Marlène, Stéphanie et Carlos, sans oublier les indispensables Stéphanie et Anne-Sophie.

Merci à Bertrand pour la masse et à Régis pour la RMN et à Bertand Perrin et à Agnès pour la HPLC et la CPV.

Un grand merci à tous mes amis pour leur aide et leur sympathie, et particulièrement à Nouredine, à Ali et à Mostafa.

*Je remercie tout particulièrement ma famille, mes parents et mes frères : **Said, Hamid, Bouchaib et Yazid** pour leurs sacrifices. Merci encore pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

*Merci à l'Agence Univesitaire de la Francophonie (**AUF**) de m'avoir accordé une bourse.*



ABREVIATIONS

ACS : acide camphorsulfonique
AIBN : 2,2'-azobisisobutyronitrile
aq. : aqueux
arom : aromatique
c : taux de conversion
CAL-B : lipase de *Candida Antartica*
CCM : chromatographie sur couches minces
CPG : chromatographie en phase gazeuse
D-AB1 : 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-ène
DCC : N,N-dicyclohexylcarbodiimide
DEAD : azodicarboxylate de diéthyle
DGJ : désoxygalactonojirimycine
DHA : dihydroxyacétone
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine
DMDP : 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine
DMF : diméthylformamide
DMJ : 1-désoxymannojirimycine
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNJ : 1-désoxynojirimycine
DNP : 2,4-dinitrophénol
DPPA : diphénylphosphorylazide
E : coefficient d'énantiosélectivité
ee : excès énantiomérique
éq : équivalent
ESI : électrospray
FAD : flavine adénine dinucléotide
FAD(H₂) : flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase (RAMA)
GB3 : globotriaoxylcéramide
Glc : glucose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GPDH : glycérolphosphate déshydrogénase
GPDH-TPI : glycérolphosphate déshydrogénase – triose phosphate isomérase
GSL: glycosphingolipide
HAJ: α -homoallonojirimycine
HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
HGJ : α -homogalactonojirimycine
HMPA : triamide hexaméthylphosphorique
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IC : ionisation chimique
IE : impact électronique
IR : infrarouge
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
LAH: hydrure de lithium aluminium
m-CPBA : acide métachloroperbenzoïque

MOM : méthoxyméthyle
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NBS : N-bromosuccinimide
N-butyl-DNJ : *N*-butyl-1-désoxynojirimycine
NI : non inhibiteur
N-méthyl-DNJ : *N*-méthyl-1-désoxynojirimycine
NMO : N-méthylmorpholine oxyde
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NT: non testé
NOEV: N-octyl-β-épivaliénamine
NOV: N-octyl-β-valiénamine
%AR : pourcentage d'activité restante
PCL : lipase de *Pseudomonas cepacia*
PDMP : D-*thréo*-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol
PPL : lipase de pancréa de porc
ppm : partie par million
PSL : lipase de *Pseudomonas species*
quant. : quantitatif
RAMA : RAbbit Muscle Aldolase
RE : réticulum endoplasmique
rév. : révélateur
RMN : résonance magnétique nucléaire
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
TA : température ambiante
TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TPAP : tétrapropylammoniumperruthénate
Ts : tosyl
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE I : LES GLYCOSIDASES ET LEURS INHIBITEURS	2
I. LES GLYCOSIDASES	6
<i>I.1. Généralités.....</i>	<i>6</i>
<i>I.2. Rôles des glycosidases</i>	<i>7</i>
I.2.1. Dégradation des polysaccharides alimentaires et de stockage	7
I.2.2. Maturation des glycoprotéines	8
<i>I.3. Mécanismes.....</i>	<i>10</i>
I.3.1. Mécanisme avec inversion de configuration.....	10
I.3.2. Mécanisme avec rétention de configuration	11
I.3.3. Modèle général de l'état de transition.....	12
I.3.4. Caractéristiques communes des mécanismes de glycosidases	14
I.3.5. Cas particuliers.....	16
I.3.5.a. Hydrolyse de N-acétyl- β -hexosaminides.....	16
I.3.5.b. 6-Phospho- β -glucosidases, NAD ⁺ -dépendantes.....	16
II. LES INHIBITEURS DE GLYCOSIDASES ET LEURS APPLICATIONS.....	17
<i>II.1. Agents antidiabétiques.....</i>	<i>18</i>
II.1.1. Inhibiteurs d' α -glucosidases intestinales	18
II.1.2. Inhibiteurs de la glycogène phosphorylase	19
<i>II.2. Agents antiviraux : Inhibiteurs d'α-glucosidases I</i>	<i>20</i>
<i>II.3. Agents thérapeutiques pour des maladies génétiques lysosomales.....</i>	<i>21</i>
II.3.1. Inhibiteurs de la céramide glucosyltransférase	21
II.3.2. Inhibiteurs de glycosidases du lysosome	23
CHAPITRE II : LES AMINOCYCLITOLS ET LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES	7
I. METHODES CHIMIQUES DE SYNTHESE DES AMINOCYCLITOLS	26
<i>I.1. Formation des carbocycles</i>	<i>26</i>
I.1.1. A partir du D-glucose.....	26
I.1.2. A partir du D-xylose	29
I.1.3. À partir du D-mannitol.....	30
<i>I.2. Synthèses à partir de produits possédant un carbocycle</i>	<i>32</i>
I.2.1. A partir de l'acide quinique	32
I.2.2. A partir du myo-inositol	33
I.2.3. A partir de divers carbocycles.....	34
<i>I.3. N-alkylation des aminocyclitols.....</i>	<i>38</i>
II. SYNTHESE DES AMINOCYCLITOLS PAR VOIE MICROBIOLOGIQUE.....	40
<i>II.1. Dégradation microbienne de la validamicyne A</i>	<i>40</i>
<i>II.2. Dégradation microbienne de l'acarbose.....</i>	<i>42</i>
III. PROPRIETES INHIBITRICES DES DIFFERENTS AMINOCYCLITOLS	42
<i>III.1. Agents antidiabétiques</i>	<i>42</i>
<i>III.2. Agents antiviraux.....</i>	<i>44</i>
<i>III.3. Agents thérapeutiques pour des maladies génétiques lysosomales</i>	<i>46</i>
CHAPITRE III : LES ALDOLASES	48
I. GENERALITES SUR LES ALDOLASES	49
II. LES DHAP ALDOLASES	50
<i>II.1. Propriétés catalytiques</i>	<i>50</i>
<i>II.2. Applications en synthèse.....</i>	<i>51</i>
<i>II.3. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase.....</i>	<i>52</i>
II.3.1. Introduction	52
II.3.2. Le site actif	52

III. LE DHAP.....	53
<i>III.1. Synthèses chimiques</i>	<i>54</i>
III.1.1. A partir de la dihydroxyacétone	54
III.1.2. A partir de la 1,3-dibromoacétone.....	54
III.1.3. A partir du glycidol	55
<i>III.2. Synthèses enzymatiques.....</i>	<i>56</i>
III.2.1. Phosphorylation directe de la dihydroxyacétone.....	56
III.2.2. Phosphorylation du glycérol puis oxydation	57
<i>III.3. Synthèses chimioenzymatiques.....</i>	<i>58</i>
III.3.1. A partir de la dibromoacétone	58
III.3.2. A partir du glycidol	59
IV. UTILISATION DE LA FBA EN SYNTHÈSE ORGANIQUE	59
<i>IV.1. Synthèse de nitrocyclitols</i>	<i>60</i>
<i>IV.2. Synthèse d'iminosucres</i>	<i>60</i>
<i>IV.3. Synthèse d'analogues du KDO</i>	<i>63</i>
NOTRE STRATEGIE.....	49
I. STRATEGIE GENERALE	65
II. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DES ALDEHYDES.....	66
III. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DU DHAP	67
RESULTATS ET DISCUSSION.....	65
I. SYNTHÈSE DU DHAP	69
<i>I.1. Protection de la DHA sous forme d'acétal.....</i>	<i>70</i>
<i>I.2. Mono estérification</i>	<i>70</i>
<i>I.3. Phosphorylation du 3-acétoxy-2,2-diméthoxy-propanol</i>	<i>70</i>
<i>I.4. Formation du dihydroxyacétone phosphate (DHAP)</i>	<i>71</i>
I.4.1. Voie A : hydrogénolyse et hydrolyse.....	71
I.4.2. Voie B	71
II. SYNTHÈSES DES ALDEHYDES NITRES	73
<i>II.1. Schéma général.....</i>	<i>73</i>
<i>II.2. Dédoublent enzymatique</i>	<i>74</i>
<i>II.3. Synthèse du 4-nitrobutanal.....</i>	<i>75</i>
<i>II.4. Synthèses des aldéhydes (pour la réaction de Henry).....</i>	<i>75</i>
II.4.1. Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal 195.....	75
II.4.1.a. Synthèse du 4,4-diéthoxybut-1-ène 194.....	75
II.4.1.b. Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal 195.....	76
II.4.2. Synthèse du 2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal 198	76
II.4.2.a. Synthèse du 1,1-diméthoxybut-3-èn-2-ol 196.....	76
II.4.2.b. Dédoublent enzymatique du 1,1-diméthoxybut-3-èn-2-ol 196	77
II.4.2.c. Synthèse du (1S) acétate de (1,1-diméthoxyméthyl)prop-2-ényle S-197	78
II.4.2.d. Synthèse des (2R) et (2S)-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal R-198 et S-198	78
<i>II.5. Synthèses des nitroalcools</i>	<i>79</i>
II.5.1. Brefs rappels sur la réaction de Henry	79
II.5.1.a. Introduction.....	79
II.5.1.b. Catalyseurs généraux de la réaction de Henry	80
II.5.1.c. Catalyseurs asymétriques.....	80
II.5.1.d. Réaction de Henry intramoléculaire	81
II.5.2. Synthèse du 4,4-diéthoxy-1-nitrobutan-2-ol 209.....	84
II.5.2.a. Synthèse en version racémique	84
II.5.2.b. Dédoublent cinétique enzymatique	84
II.5.3. Synthèse du 4,4-diméthoxy-1-nitrobutan-2,3-diol.....	86
II.5.3.a. Synthèse du (2R)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol (2R)-212	86
II.5.3.b. Synthèse du (2S)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol (2S)-212.....	87
II.5.4. Synthèse du 1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2-ol 233.....	88

II.5.4.a. Schéma général	88
II.5.4.b. Elimination du groupement hydroxyle et réduction	88
II.5.4.c. Hydrolyse de l'ester	89
II.6. Déprotection des aldéhydes	89
III. SYNTHESE DES NITROCYCLITOLS	90
III.1. Préparation du trihydroxy hydroxymethyl nitrocyclitol 221	90
III.2. Préparation des tétrahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols 226 et 227	93
III.3. Préparation des pentahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols 228 et 229	96
III.4. Préparation des pentahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols 230 et 231	97
III.5. Préparation des tétrahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols 232 et 233	98
IV. SYNTHESE DES AMINOCYCLITOLS	100
IV.1. Aminocyclitols par réduction du groupement nitro	100
IV.2. Synthèse des zwitterions	101
IV.3. Synthèse d'un aminocyclitol alkylé	102
V. EVALUATION DES PROPRIETES INHIBITRICES	103
V.1. Brefs rappels de cinétique enzymatique	103
V.2. Inhibition compétitive	104
V.3. Données de la littérature	105
V.4. Détermination des constantes de Michaelis	107
V.5. Première famille	109
V.5.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur	109
V.5.2. Résultats	110
V.5.3. Détermination des constantes d'inhibition	111
V.5.3.a. Principe	111
V.5.3.b. Résultats	111
V.6. Deuxième famille	113
V.6.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur	113
V.6.2. Détermination des constantes d'inhibition	114
V.6.3. Cas particulier de l'aminocyclitol 239	115
V.7. Troisième famille	115
V.8. Conclusion	116
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	117
PARTIE EXPERIMENTALE	118
I. GENERALITES	124
I.1. Nomenclature et numérotation	124
I.2. Techniques chromatographiques	124
I.3. Techniques spectroscopiques et d'analyse	124
II. SYNTHESE DU DHAP	126
III. LES ACETALS, PRECURSEURS DE LA REACTION DE HENRY	131
III.1. Synthèse des alcènes	131
III.2. Ozonolyse	135
III.2.1. Protocole général	135
III.2.2. Synthèses des aldéhydes	135
IV. SYNTHESE DES NITROACETALS	138
V. SYNTHESE DES NITROALDEHYDES	149
V.1. Synthèse du 4-nitrobutanal	149
V.2. Synthèse des nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés	150
V.2.1. Protocole Général	150
V.2.2. Nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés	150
VI. SYNTHESE DES NITROCYCLITOLS	153
VI.1. A partir du 4-nitrobutanal	153

VI.2. A partir des aldéhydes α et/ou β hydroxylés.....	155
VI.2.1. Protocole général.....	155
VI.2.2. Synthèse	155
VII. SYNTHÈSE DES AMINOCYCLITOLS	163
VII.1. Schéma général	163
VII.2. Synthèse.....	163
VIII. SYNTHÈSE DES ZWITTERIONS.....	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178
ANNEXES	186
I. DOSAGES ENZYMATIQUES	187
I.1. Dosage du DHAP.....	187
I.2. Dosage de l'activité enzymatique de l'aldolase.....	187
I.3. Détermination des constantes cinétiques des différents aldéhydes avec la RAMA .	188
II. EVALUATION DES PROPRIETES INHIBITRICES.....	190
II.1. Généralités.....	190
II.2. Détermination des constantes de Michaelis	191
II.3. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur	192
II.4. Détermination des constantes d'inhibition	192
II.4.1. Détermination précise	192
II.4.2. Détermination rapide	193

INTRODUCTION

L'utilisation d'enzymes en synthèse organique s'impose à l'heure actuelle du fait des nombreux avantages qu'elles présentent. Elles peuvent souvent accepter une grande variété de substrats, bien que la réaction soit en général plus lente qu'avec le substrat naturel. L'intérêt des bioconversions et leur développement sont liés à leurs principales caractéristiques :

- Elles permettent d'adopter des conditions douces de réaction,
- elles travaillent en milieu aqueux, ce qui évite les problèmes de solubilité parfois rencontrés dans les solvants organiques.
- les réactions sont régiosélectives, elles permettent la transformation spécifique d'un groupement dans une molécule polyfonctionnelle,
- les réactions sont stéréosélectives, l'enzyme conduit à la création de centres chiraux de stéréochimie déterminée,
- les réactions sont énantiosélectives, souvent l'enzyme ne transforme qu'un seul isomère.

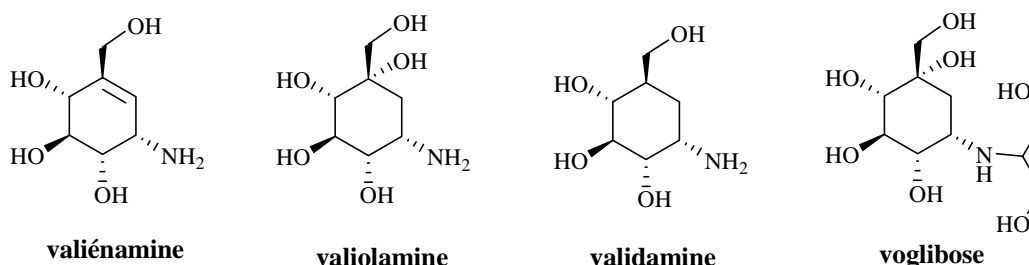
Depuis quelques années, l'équipe Bioconversion et Synthèse Organique du laboratoire SEESIB s'intéresse au développement et à l'utilisation de catalyseurs biologiques pour synthétiser des molécules à activité biologique.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un programme de recherche concernant l'utilisation d'aldolases, en particulier la fructose-1,6-bisphosphate aldolase, pour la préparation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases. Cette aldolase permet la formation stéréosélective d'une liaison carbone-carbone, à partir d'un substrat donneur à 3 ou plus carbones et d'un substrat accepteur aldéhydique.

Les glycosidases sont des enzymes très importantes, largement exploitées dans les domaines des biotechnologies, de l'alimentaire, de la chimie du bois ou de la recherche médicale. Elles sont notamment utilisées pour la synthèse enzymatique d'oligosaccharides complexes dans des conditions douces.

De nombreux inhibiteurs de ces enzymes existent et jouent un rôle important à la fois dans l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes d'hydrolyse enzymatique des glucides, mais aussi comme outil thérapeutique. Parmi ces inhibiteurs, les iminosucres et les carbasucres, analogues de sucres dont l'atome d'oxygène a été remplacé respectivement par un atome d'azote et un atome de carbone, sont des composés particulièrement actifs. Certains sont même actuellement commercialisés en tant qu'antidiabétiques.

Dans ce contexte, nos molécules modèles sont des produits naturels tels que la valiénamine, la valioline et la validamine et font partie de la famille des aminocyclitols.



Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à développer une voie de synthèse permettant d'accéder à des analogues de ces produits naturels. Les produits que nous avons pour objectif de préparer diffèrent des molécules citées par la position du groupement amino et des stéréochimies des fonctions alcools.

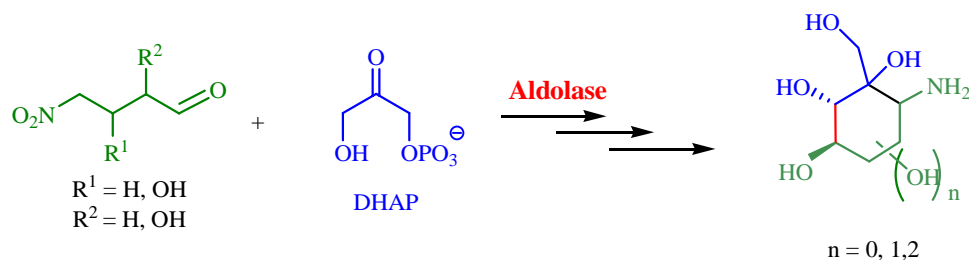


Schéma général

Dans ce manuscrit une étude bibliographique concernera les glycosidases, leurs rôles et leurs mécanismes. Après avoir décrit les principaux inhibiteurs et leurs applications, un paragraphe sera plus particulièrement centré sur les aminocyclitols et leurs propriétés inhibitrices. Une brève étude de l'aldolase (FBA), ses propriétés et son utilisation en synthèse organique seront présentés. Associées à l'utilisation de cette enzyme, les synthèses du dihydroxyacétone phosphate seront décrites.

Les résultats que nous avons obtenus seront ensuite exposés et discutés. Ils concerneront, dans un premier temps, la synthèse du DHAP, substrat incontournable de l'aldolase puis les synthèses des nitroaldéhydes avec les dédoublements enzymatiques. Dans un deuxième temps les réactions de couplage catalysées par la FBA seront décrites. Enfin, les résultats de l'évaluation des propriétés inhibitrices de ces composés sur plusieurs glycosidases seront présentés et commentés.

Une conclusion dressant le bilan des résultats, ainsi que les perspectives à apporter termineront ce travail.

Une partie expérimentale en fin de document détaillera l'ensemble des protocoles mis en œuvre, ainsi que les analyses effectuées.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
LES GLYCOSIDASES ET LEURS INHIBITEURS

I. Les glycosidases

I.1. Généralités

Les glycosidases ou glycoside-hydrolases catalysent sélectivement l'hydrolyse de la liaison glycosidique dans les polysaccharides, les saccharides et les glycoconjugués assurant par exemple la rupture de la liaison entre les deux unités d'un disaccharide (**Figure 1**: exemple du maltose). Cette hydrolyse permet la libération de molécules non saccharidiques, de monosaccharides ou d'oligosaccharides de plus faible poids moléculaire.

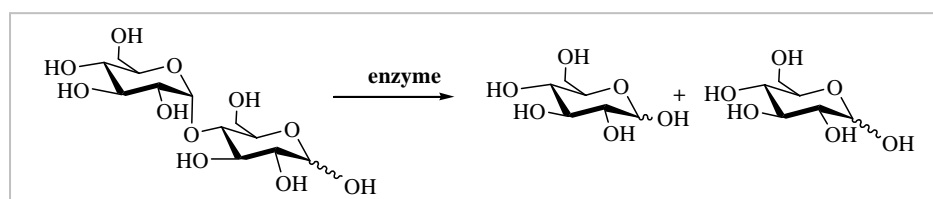


Figure 1: exemple du maltose

On distingue les « exoglycosidases » et les « endoglycosidases ». Les premières hydrolysent des liaisons glycosidiques terminales dans les chaînes oligosaccharidiques et les secondes des liaisons internes. Les exoglycosidases sont relativement indifférentes vis-à-vis de la nature du groupement lié au carbone anomérique, tandis que les endoglycosidases sont spécifiques de la nature et de la configuration des deux sucres qu'elles séparent.

Chaque glycosidase est spécifique de l'unité glucidique hydrolysée, de sa série D ou L, de sa forme furanique ou pyranique et de la configuration de la liaison glycosidique α ou β . Ainsi les α -D-glucosidases hydrolysent les α -D-glucosides, les β -D-galactosidases les β -D-galactosides etc. De plus, au sein de chaque famille, il existe de petites variations selon l'origine de l'enzyme¹.

Selon la nomenclature établie par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) et basée sur la spécificité de substrat, les glycosidases font partie de la famille EC 3.2.1., dans laquelle le chiffre 3 correspond aux hydrolases, le chiffre 2 aux glycosylases et le chiffre 1 aux O- et S-glycosidases.

Une autre classification de ces enzymes basée sur les séquences d'acides aminés et permettant de mieux rendre compte des similitudes en terme de mécanisme et de structure tridimensionnelle a été proposé par Henrissat². Actuellement cette classification contient près de 200 familles de glycosidases, glycosyltransférases, polysaccharides lyases et carbohydate estérases. Elle est régulièrement mise à jour et consultable sur Internet³.

¹ David, S. *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres* **1995**, InterEditions / CNRS Editions, 58-61.

² Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, 280, 309-316.

³ Coutinho, P. M. ; Henrissat, B. *Carbohydrate-Active Enzymes Server* **1999**, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>

I.2. Rôles des glycosidases

Les glycosidases sont des enzymes très répandues et elles sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques fondamentaux du métabolisme des sucres : la digestion des polysaccharides alimentaires, la dégradation des polysaccharides au niveau du lysosome ou encore la glycosylation des protéines au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi⁴.

Ce paragraphe n'a pas pour vocation de détailler l'ensemble des fonctions assurées par les glycosidases, qui sont d'ailleurs pour certaines encore mal connues, mais d'en donner quelques exemples chez l'homme⁵.

I.2.1. Dégradation des polysaccharides alimentaires et de stockage

Les glycosidases sont responsables de la digestion des polysaccharides de l'alimentation dans les différents sites de digestion des glucides comme la bouche et l'intestin grêle. L'action de l' α -amylase salivaire (ptyaline) sur les amidons et le glycogène contenant des liaisons α -(1,4) et α -(1,6) (**Figure 2**) délivre un mélange d'oligosaccharides ramifiés, de maltose et de glucose. L'hydrolyse par cette enzyme se poursuit jusqu'à l'estomac. L' α -amylase pancréatique transforme l'amidon en maltose, maltotriose et dextrines.

Les enzymes de l'intestin, sécrétées par les cellules muqueuses intestinales assurent ensuite l'hydrolyse complète. Ces enzymes sont localisées à la surface des cellules épithéliales qui tapissent l'intestin grêle. Le maltose et le lactotriose sont hydrolysés par la maltase et les dextrines par l' α -dextrinase pour donner du glucose. De même, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose par la saccharase et le lactose en glucose et galactose par la lactase.

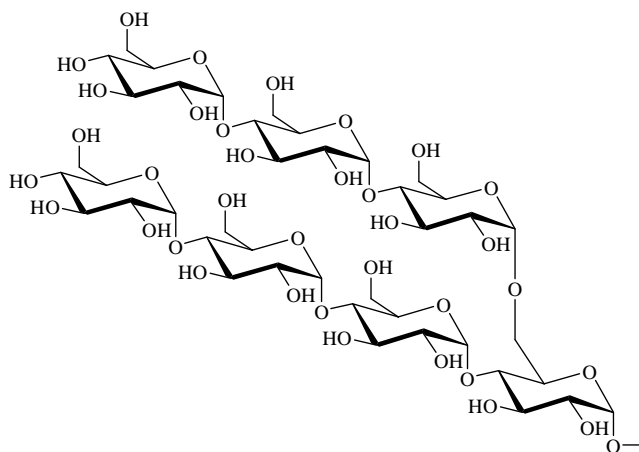
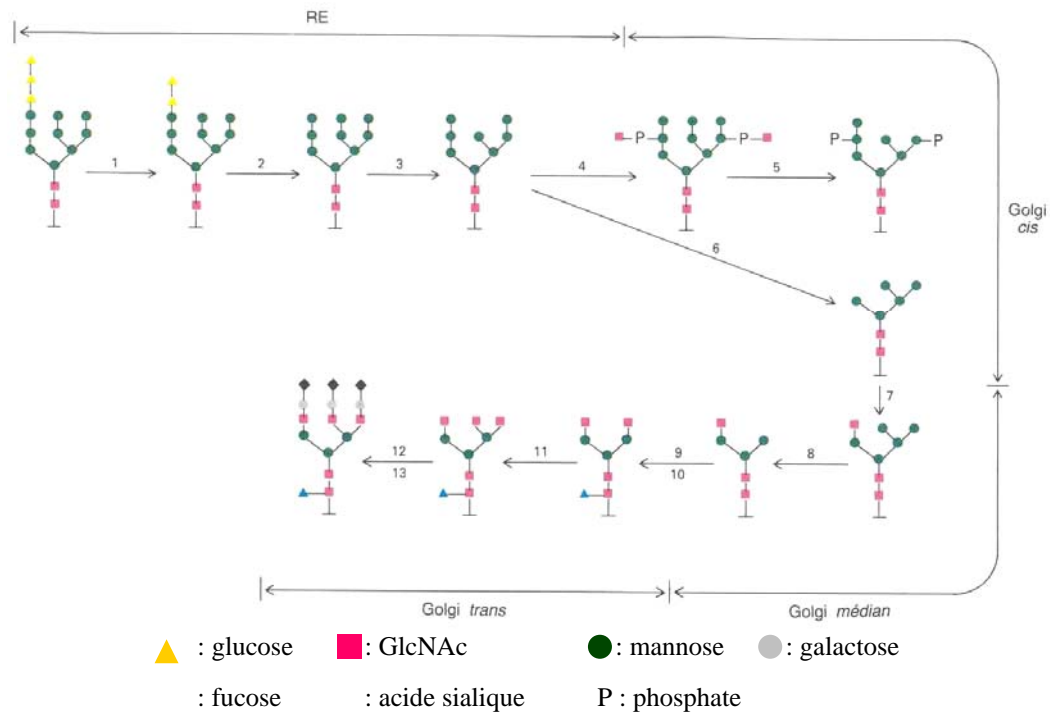


Figure 2

Le glycogène est stocké dans le foie et les muscles. Sa concentration est plus élevée dans le foie, mais les muscles en contiennent plus en raison de leur plus grande masse. Son hydrolyse par différentes enzymes, dont une α -1,6-glucosidase, permet d'apporter rapidement de l'énergie sous forme de glucose aux différents organes.

⁴ Winchester B. *Biochem. Soc. Trans.*, **1992**, 699.

⁵ Stryer, L. *La biochimie de Lubert Stryer* **1992**, Médecine-Sciences Flammarion.



- (1) : glucosidase I ; (2) : glucosidase I ; (3) : α -1,2-mannosidase du réticulum endoplasmique ;
 (4) : *N*-acétylglucosaminyl-phosphotransférase ; (5) : phosphodiester glycosidase ; (6) : mannosidase I de l'appareil de Golgi ; (7) : GlcNAc transférase I ; (8) : mannosidase II ; (9) : GlcNAc transférase II ;
 (10) : fucosyl transférase ; (11) : GlcNAc transférase IV ; (12) : galactosyl transférase ; (13) : sialyl transférase.

Figure 4

Dans les autres compartiments de l'appareil de Golgi, des sucres sont ajoutés par l'intermédiaire de glycosyl transférases ou retirés par des glycosidases, pour former des structures saccharidiques plus ou moins complexes (étapes 6 à 13, **Figure 4**). Les glycoprotéines devenues matures sont ensuite envoyées vers leurs sites d'activité : le lysosome, la membrane ou les vésicules de sécrétion (**Figure 5**)⁵.

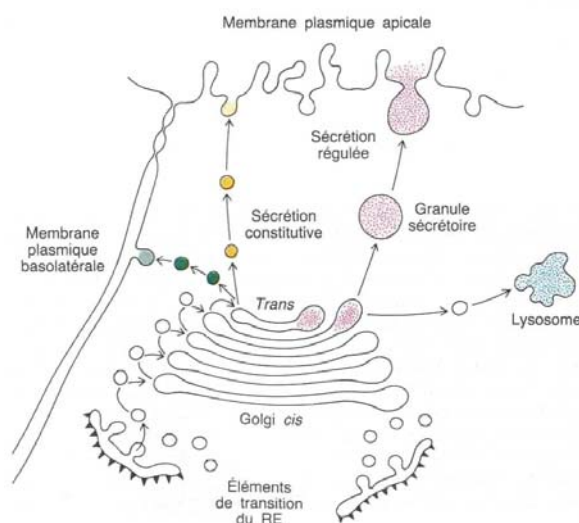


Figure 5

⁵ Stryer, L. *La biochimie de Lubert Stryer* **1992**, Médecine-Sciences Flammarion.

I.3. Mécanismes

Les glycosidases agissent dans l'organisme selon deux mécanismes catalytiques, proposés pour la première fois par Koshland en 1953⁸. Avec seulement quelques légères variations, ces propositions ont résisté à l'épreuve du temps et sont toujours d'actualité⁹. En effet, l'hydrolyse enzymatique de la liaison glycosidique peut avoir lieu selon deux mécanismes généraux aboutissant à la libération :

- Soit d'un glucide ayant un carbone anomérique de même configuration que celui du substrat, on parlera alors d'un mécanisme avec *réétention de configuration*.
- Soit d'un glucide ayant une configuration anomérique inverse de celle du substrat, on parlera alors d'un mécanisme avec *inversion de configuration*.

Ces mécanismes mettent en jeu deux groupements carboxyliques clefs provenant de résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme dont les rôles et les positions relatives diffèrent dans les deux cas.

I.3.1. Mécanisme avec inversion de configuration

C'est le mécanisme le moins répandu. Il correspond à une substitution nucléophile s'effectuant selon un mécanisme concerté. L'un des groupements carboxyliques permet le départ de l'aglycone par son rôle de catalyseur acide (HA), tandis que l'autre sous forme de carboxylate déprotone (B⁻) l'eau pour favoriser son attaque sur le carbone anomérique, selon un processus de catalyse acide-base générale. Cette réaction s'effectue en passant par un état de transition dont la structure est proche de celle d'un cation oxocarbénium (**Figure 6**).

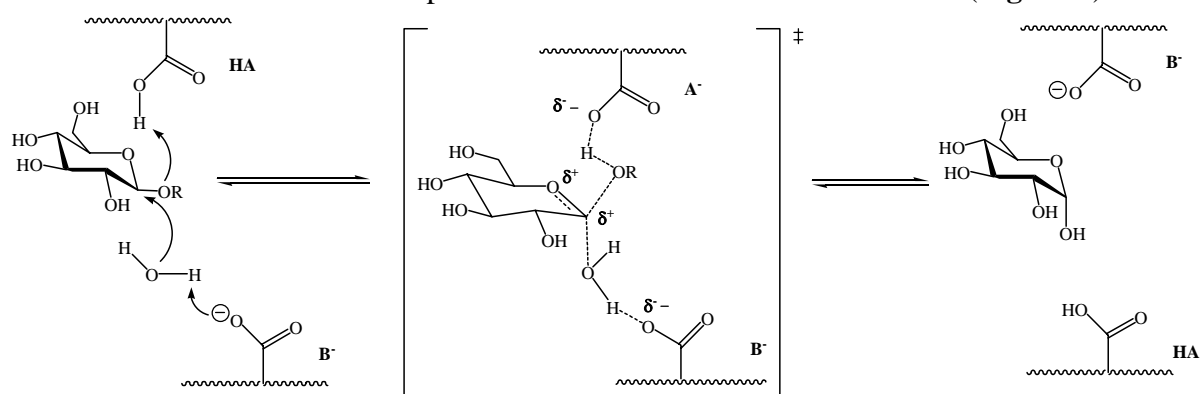


Figure 6

Dans ce cas, les deux groupements carboxyliques doivent être suffisamment éloignés pour permettre l'insertion du substrat et de la molécule d'eau. En effet, pour ce type de glycosidases, une distance moyenne de 10,5 Å entre les deux acides aminés a été mise en évidence^{10,11}.

⁸ Koshland D.E. *Biol. Rev.*, **1953**, 28, 416.

⁹ Davies, G. J. ; Gloster, T. M. ; Henrissat, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 637-645.

¹⁰ McCarter, J. D. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 885-892.

¹¹ Wang, Q. ; Graham, R. W. ; Trimbur, D. ; Warren, R. A. J. ; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11594-11595.

I.3.2. Mécanisme avec rétention de configuration

La rétention de configuration est dans ce cas le résultat de deux inversions successives au niveau du carbone anomérique du substrat et implique le passage par un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Un mécanisme catalytique illustré par la **Figure 7** ci-dessous a été proposé

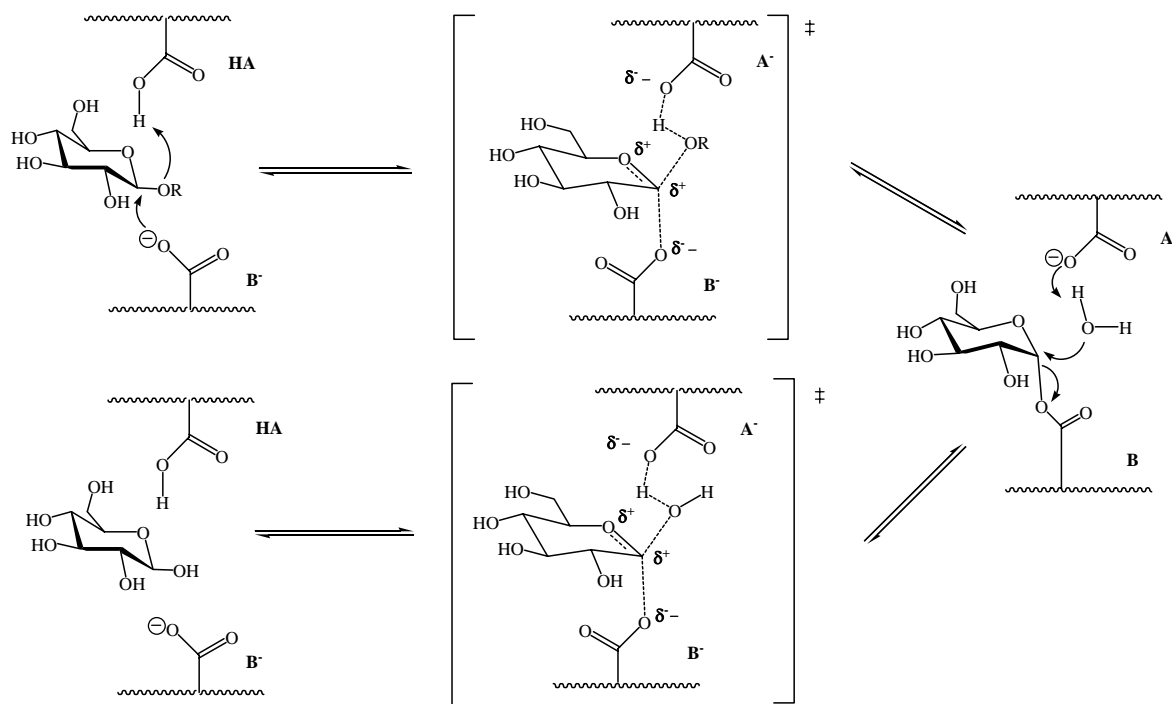


Figure 7

Comme indiqué précédemment, le site actif de l'enzyme comporte deux groupements carboxyliques, situés de chaque côté du plan du cycle. L'un agit comme donneur de proton (noté HA), l'autre comme nucléophile (noté B⁻). Le groupement -OR est protoné par le résidu HA et le deuxième résidu, B⁻, intervient pour réaliser la substitution nucléophile. Le substrat se retrouve lié de façon covalente au site actif. L'aglycone libéré sort du site actif et est remplacé par une molécule d'eau. Ensuite le processus inverse a lieu : simultanément et en passant par un autre état de transition, la base conjuguée de l'acide HA déprotonne l'eau et celle-ci attaque le carbone anomérique pour hydrolyser l'ester entre le sucre et B. Ce mécanisme implique aussi une catalyse acide base générale.

Étant donné que l'attaque nucléophile par B⁻ se fait directement sur le sucre, les deux acides carboxyliques doivent être assez proches. Et effectivement, des études ont montré que ces deux groupements n'étaient distants en moyenne que de 5 Å.^{10,11,12}

Des travaux publiés par Vasella¹³ ont permis d'apporter de nombreuses informations quant à la disposition de ces groupements carboxylates dans le site actif d'une β-glycosidase

¹⁰ McCarter, J. D. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 885-892.

¹¹ Wang, Q.; Graham, R. W.; Trimbur, D.; Warren R. A. J.; Withers, S. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 11594.

¹² Ly H. D., Withers S. G. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 487 et références citées.

¹³ Heightman, T. D. ; Vasella, A. T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2300.

qui hydrolyse selon un mécanisme avec rétention de configuration. Selon cette étude, ces enzymes ne protonent pas leur substrat depuis le dessus mais plutôt par le côté et cela implique que la protonation par le donneur (résidu acide) se fasse en *anti* (**Figure 8A**, en bleu) ou en *syn* (**Figure 8B**, en rouge). *Syn* et *anti* sont définis par rapport à l'oxygène du cycle pyranique et au doublet libre de l'oxygène exocyclique qui se trouve dans le plan du cycle. La liaison C-O "bleue" est en *anti* par rapport au doublet "bleu".

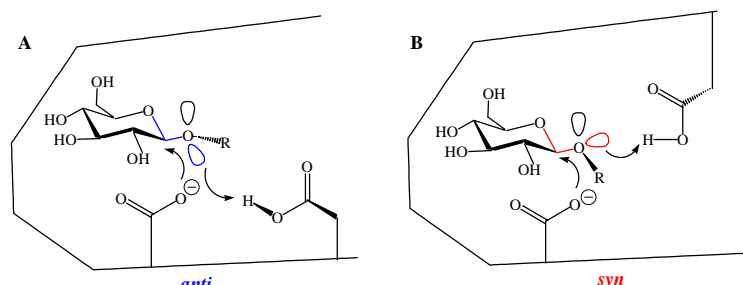


Figure 8

I.3.3. Modèle général de l'état de transition

La connaissance des mécanismes et donc des états de transition impliqués dans les réactions catalysées par des enzymes est fondamentale. En effet, de nombreuses stratégies de synthèse d'inhibiteurs sont orientées vers la création de molécules mimant les états de transition, ceux-ci étant considérés comme les structures les plus fortement liées par l'enzyme au cours du chemin réactionnel.

Dans le cas des glycosidases, quel que soit le mécanisme mis en jeu les états de transition ont des similitudes et deux caractéristiques essentielles peuvent être plus particulièrement retenues :

- Une distorsion du cycle du substrat fixé dans le site actif par rapport à l'état fondamental de la molécule qui se traduit par une structure intermédiaire entre les conformations demi-chaise, bateau et twist (**Figure 9**).

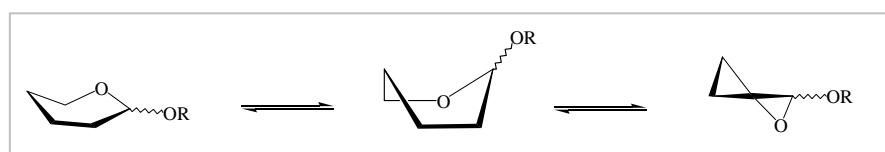


Figure 9

- Le passage par un intermédiaire portant une charge positive partagée entre le carbone anomérique et l'oxygène endocyclique, ce qui implique la présence d'un caractère de double liaison entre ces deux atomes. L'état de transition posséderait alors une structure proche d'un ion oxocarbenium (**Figure 10**).

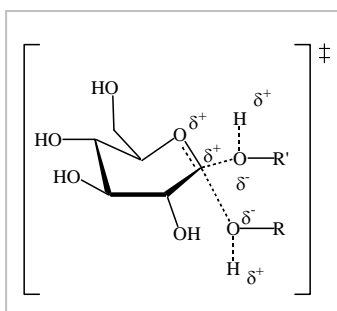


Figure 10

Une telle distorsion faciliterait le passage de l'état de transition à l'intermédiaire cationique en permettant le recouvrement des orbitales pour la formation de l'ion oxocarbénium (voir plus loin) et/ou en diminuant des interactions stériques défavorables avec les protons H₃ et H₅ lors de l'attaque par le nucléophile¹⁴. Ce phénomène a surtout été décrit pour les β-glycosidases avec rétention de configuration. Un diagramme (**Figure 11**) illustrant leur mécanisme a été proposé par Vasella et coll¹⁵.

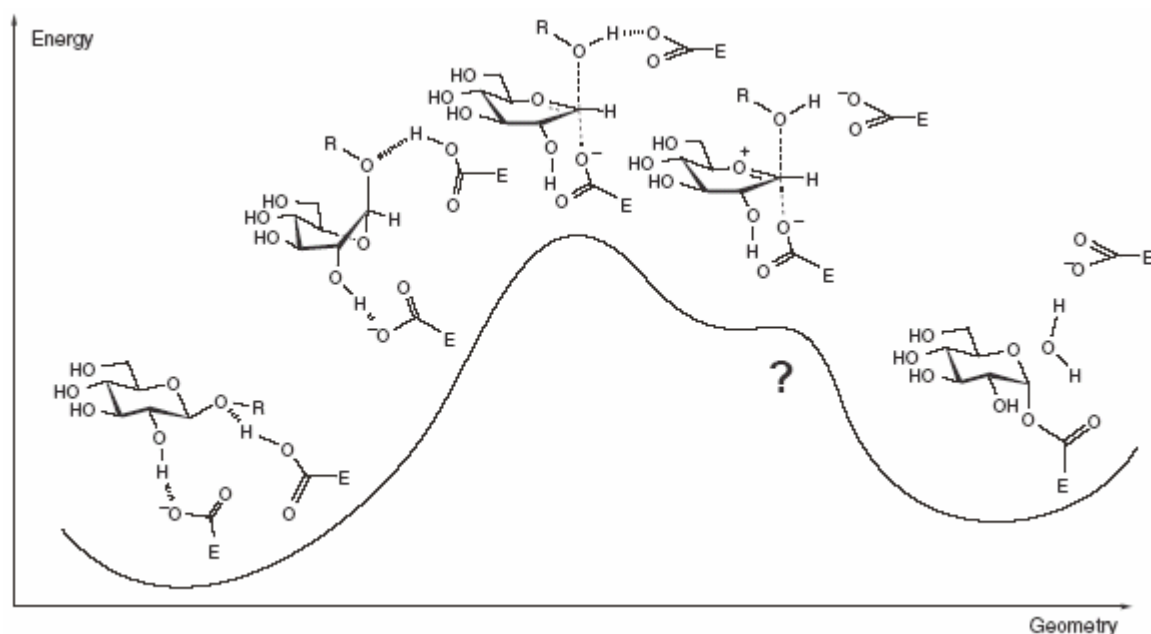


Figure 11

Dans cette figure, on distingue clairement la distorsion du cycle qui induit une orientation pseudoaxiale de la liaison glycosidique. Cette orientation entraîne le recouvrement de l'orbitale occupée par l'une des paires d'électrons libres de l'oxygène endocyclique avec l'orbitale antiliante de la liaison glycosidique, ce qui constitue un facteur favorable à l'hydrolyse de la liaison^{16,17}.

¹⁴ Rye C. S., Withers S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 573.

¹⁵ Vasella, A. ; Davies, G. J. ; Böhm, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 619-629.

¹⁶ Sulzenbacher, G. ; Driguez, H. ; Henrissat, B. ; Schülein, M. ; Davies, G. J. *Biochemistry* **1996**, 35, 15280-15287.

¹⁷ Davies, G. J. ; Mackenzie, L. ; Varot, A. ; Dauter, M. ; Brzozowski, A. M. ; Schülein, M. ; Withers, S. G. *Biochemistry* **1998**, 37, 11707-11713.

Il reste une incertitude sur la conformation réellement adoptée dans l'état de transition par l'ion oxocarbénium.

Très récemment, grâce aux travaux de Rose et coll¹⁸ sur une α -mannosidase avec rétention de configuration, il a été montré que les α -glycosidases peuvent aussi induire ces distorsions. Par ailleurs, les auteurs suggèrent que cette distorsion de l'intermédiaire est probablement une caractéristique répandue chez d'autres α -glycosidases agissant avec rétention de configuration.

Une étude de Withers et coll¹⁹ sur des α et β -glycosidases avec rétention de configuration, a permis de relever une différence fondamentale dans leur mécanisme, notamment au niveau des états de transition (**Figure 12**).

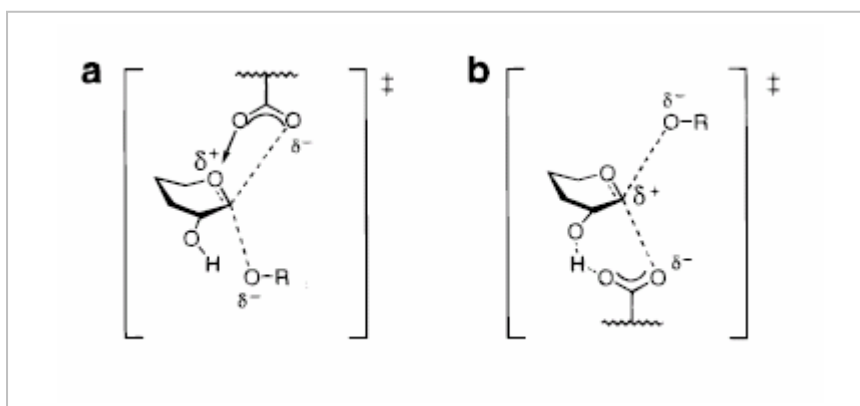


Figure 12

Pour une β -glycosidase (**Figure 12 b**), l'interaction *syn* du résidu carboxylate avec le centre anomérique et l'hydroxyle en position 2 va plutôt favoriser le développement de la charge positive sur le carbone anomérique.

Cette interaction n'est pas possible pour une α -glycosidase, une interaction *syn* prend naissance entre le résidu carboxylate et l'oxygène endocyclique (**Figure 12 a**) et le centre anomérique. Dans ce cas, c'est sur l'oxygène endocyclique que la charge positive va se développer.

1.3.4. Caractéristiques communes des mécanismes de glycosidases

Par criblage informatique des séquences catalytiques de glycosidases, Stam et al²⁰ ont étudié les mécanismes réactionnels avec inversion et rétention de configuration de plusieurs familles de glycosidases. Des caractéristiques communes ont été mise en évidence entre des α et β -glycosidases bien qu'elles soient de stéréospécificité très différentes.

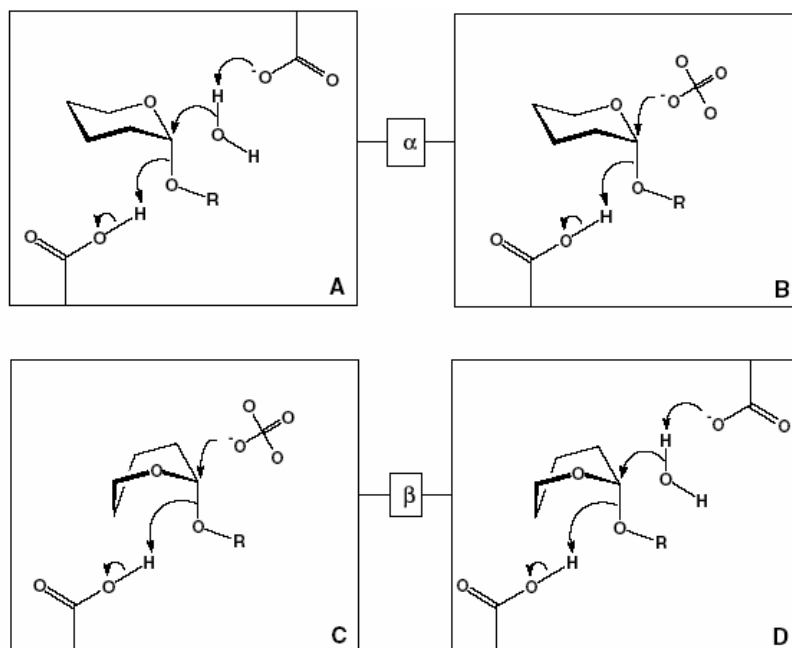
Notamment, chez des familles de glycoside hydrolases et des familles de disaccharide phosphorylases agissant avec inversion, l'hydrolyse des anomères α et β est favorisée par une orientation axiale de la liaison glycosidique (**Figure 13**).

¹⁸ Numao, S. ; Kuntz, D. A. ; Withers, S. G. ; Rose, D. R. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 48074-48083.

¹⁹ Zechel, D. L. ; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 11-18.

²⁰ Stam, M. R. ; Blanc, E. ; Coutinho, P. M. ; Henrissat, B. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2728.

Si pour l'anomère α cette orientation est directe (A et B), en revanche pour l'anomère β , une distorsion du cycle est nécessaire avant la substitution nucléophile (C et D, **Figure 13**).



A : Mécanisme réactionnel des familles de glycoside hydrolases sur un anomère α .

B : Mécanisme réactionnel de disaccharide phosphorylases sur un anomère α .

C : Mécanisme réactionnel de disaccharide phosphorylases de la famille sur un anomère β .

D : Mécanisme réactionnel des familles de glycoside hydrolases sur un anomère β .

Figure 13

De même, pour une famille de glycoside hydrolases agissant selon un mécanisme avec rétention de configuration, une distorsion du cycle a lieu avant la formation de la liaison covalente entre le substrat et l'enzyme (**Figure 14**).

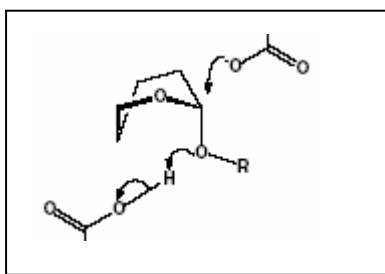


Figure 14

A l'issue de cette étude, les auteurs suggèrent que la Nature a été capable de faire évoluer une enzyme β -spécifique en α -spécifique, ou inversement, en prenant avantage de cette nécessité d'orientation en axial de la liaison glycosidique, pour faciliter l'attaque du nucléophile. Les enzymes étudiées auraient donc des ancêtres communs.

I.3.5. Cas particuliers

Certaines enzymes sortent de ce cadre général présenté jusqu'à présent. Nous avons choisi d'illustrer deux exemples parmi les plus récents.

I.3.5.a. Hydrolyse de *N*-acétyl- β -hexosaminides

Pour certaines *N*-acétyl- β -hexosaminidases fonctionnant selon un mécanisme avec rétention de configuration, la réaction d'hydrolyse enzymatique passe par un intermédiaire oxazolinium^{21,22}. En effet, c'est le groupement *N*-acétyl du substrat qui joue ici le rôle du nucléophile (**Figure 15**).

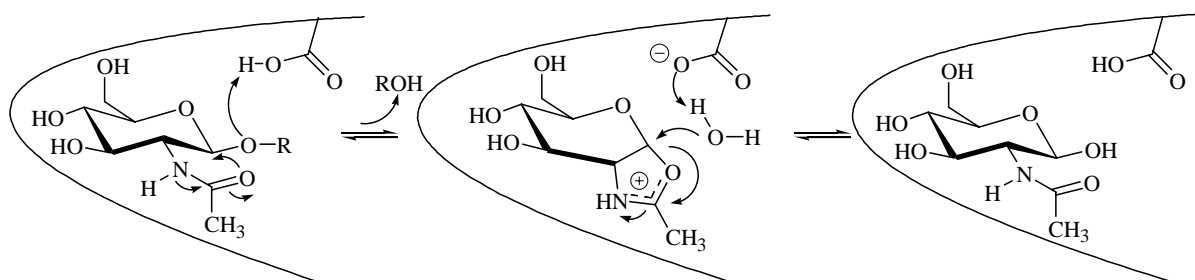


Figure 15

I.3.5.b. 6-Phospho- β -glucosidases, NAD^+ -dépendantes

Cet autre exemple illustre un mécanisme fondamentalement différent, rencontré dans la famille GH4 des glycosidases²³. Il s'agit d'enzymes à NAD^+ et à cation métallique divalent, ce qui les distingue nettement des autres glycosidases.

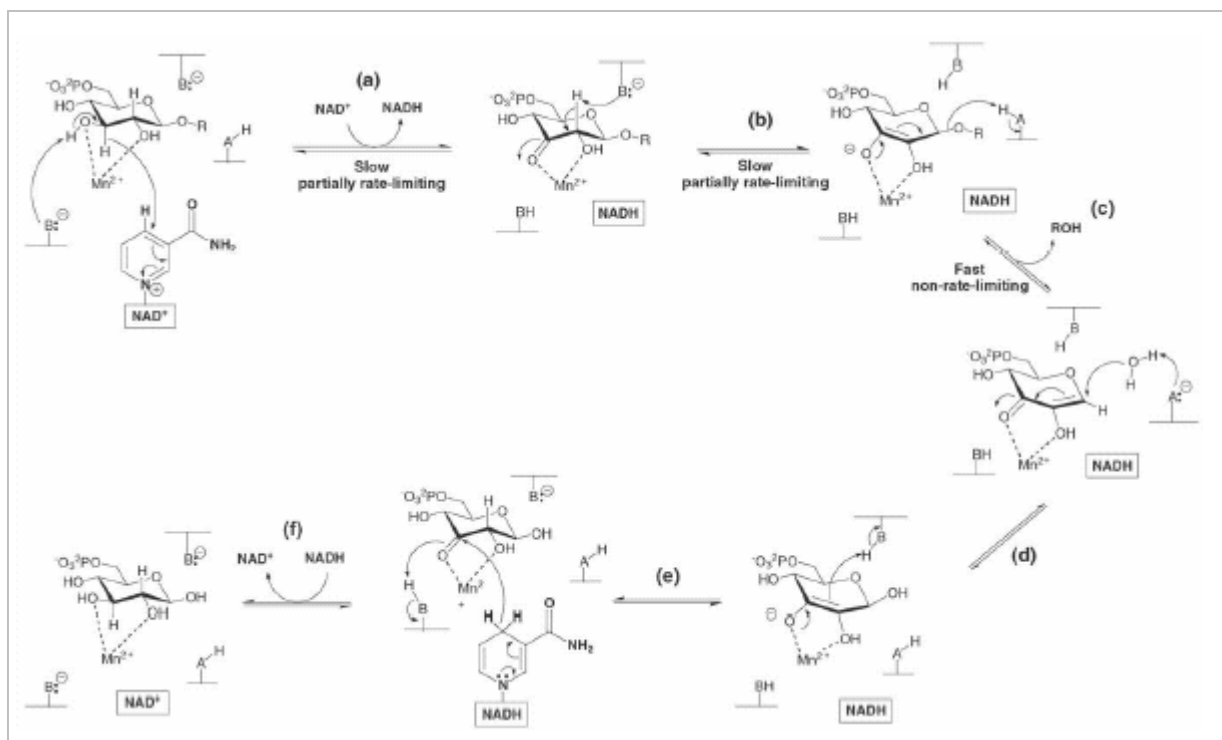
Comme le montre la **Figure 16**, l'enzyme va d'abord oxyder l'alcool en position 3 grâce à NAD^+ , pour activer le proton en position 2 et faciliter la réaction d'élimination de R-OH. L'eau est ensuite additionnée, puis le carbonyle est réduit en alcool par NADH. Le cation divalent permet entre autres de stabiliser l'énolate intermédiaire. Le bilan de la réaction est l'hydrolyse du substrat.

Il est important de noter que l'état de transition dans ce cas est anionique et non plus cationique.

²¹ Terwisscha van Scheltinga, A. C. ; Armand, S. ; Kalk, K. H. ; Isogai, A. ; Henrissat, B. ; Dijkstra, B. W. *Biochemistry* **1995**, 34, 15619-15623.

²² Mark, B. L. ; Vocadlo, D. J. ; Knapp, S. ; Triggs-Raine, B. L. ; Withers S. G. ; James, M. N. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10330-10337.

²³ Yip, V. L. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 147-155.



Mécanisme proposé pour la 6-phospho- β -glucosidase.

- (a) abstraction de l'hydrure de C3 par NAD^+ (alcool oxydé en cétone).
- (b) abstraction du proton de C2 par un résidu basique, l'enediolate est stabilisé par Mn^{2+} .
- (c) β -élimination.
- (d) addition d'eau de type 1,4-Michaël au centre anionique.
- (e) protonation.
- (f) réduction du carbonyle en C3 par NADH.

Figure 16

II. Les inhibiteurs de glycosidases et leurs applications

Les inhibiteurs de glycosidases qui ont été isolés ou synthétisés sont souvent des structures mimant le substrat naturel de l'enzyme²⁴ ou l'état de transition, avec une distorsion de cycle, une charge positive ou combinant les deux (**Figure 10**). La plupart du temps les configurations des centres asymétriques sont identiques ou proches du substrat naturel de l'enzyme.

L'objet de ce paragraphe n'est pas de rapporter de façon exhaustive ces inhibiteurs. Selon leurs applications, quelques exemples de structures seront présentés.

Pour mieux faire le lien avec les objectifs de ce travail, nous insisterons plus particulièrement sur la famille des aminocyclitols, où un carbocycle polyhydroxylé porte une fonction amine primaire ou secondaire. Il existe bien d'autres familles que nous ne détaillerons pas comme les iminisucres qui comprennent des hétérocycles polyhydroxylés de type pipéridine et pyrrolidine.

²⁴ Asano, N. ; Nash, R. J. ; Molyneux, R. J. ; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680.

Les inhibiteurs de glycosidases trouvent principalement des applications en tant qu'agents antidiabétiques, agents antiviraux ou agents pour traiter des maladies génétiques²⁵.

II.1. Agents antidiabétiques

Il existe deux cibles principales dans ce domaine, les α -glucosidases intestinales et la glycogène phosphorylase.

II.1.1. Inhibiteurs d' α -glucosidases intestinales

Pour le traitement du diabète de type II, non-insulino dépendant, les α -glucosidases intestinales constituent une cible de choix. Leur inhibition permet de limiter ou réguler le taux de glucose dans le sang.

Isolé dans les années 70 d'une souche d'*Actinoplanes*, l'acarbose **1** est un pseudotétracosaccharide composé d'une unité aminocyclitol insaturée liée à un aminodidésoxyglucose, lui-même lié à un résidu maltose (**Figure 17**). C'est un puissant inhibiteur d' α -glucosidases intestinales ($IC_{50} = 0,5 \mu M$, saccharase). A ce titre, il est commercialisé sous le nom Glucor[®] ou Glucobay[®] par la société Bayer pour le traitement du diabète de type II.

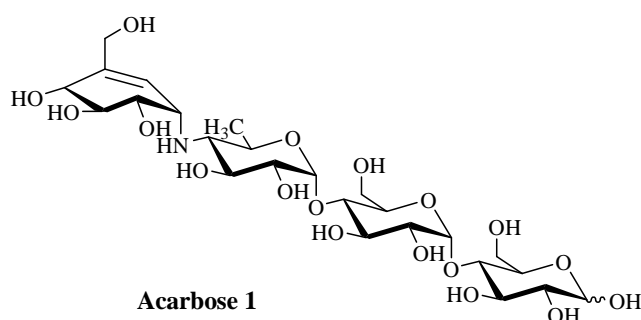


Figure 17

L'activité importante de ce composé est probablement liée au fait qu'il présente plusieurs caractéristiques en commun avec l'état de transition : mème de l'oxygène exocyclique chargé positivement grâce à l'atome d'azote protonable à pH physiologique et la distorsion de cycle grâce à la double liaison, même si celle-ci ne se situe pas entre le carbone pseudo-anomérique et le carbone remplaçant l'oxygène endocyclique.

La valioline **2** (**Figure 18**), isolé en 1984²⁶, d'une souche de *Streptomyces hygroscopicus*, est un excellent inhibiteur d' α -glucosidases comme la maltase ($IC_{50} = 2,2 \mu M$) et la saccharase ($IC_{50} = 0,049 \mu M$) intestinales. Le voglibose **3** préparé à partir de la valioline **2** est un des plus puissants inhibiteurs d' α -glucosidases ($IC_{50} = 0,0158 \mu M$; maltase et $IC_{50} = 0,0046 \mu M$; saccharase). Il est actuellement commercialisé en Asie sous le nom Basen[®] par la société Takeda pour le traitement du diabète de type II.

²⁵ Asano, N. *Glycobiology* **2003**, 13, 93R-104R.

²⁶ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Takeuchi, M. ; Yamaguchi, T. ; Matsui, K. ; Horii, S. ; Fukase, H. *J. Antibiot.* **1984**, 37, 1301-1307.

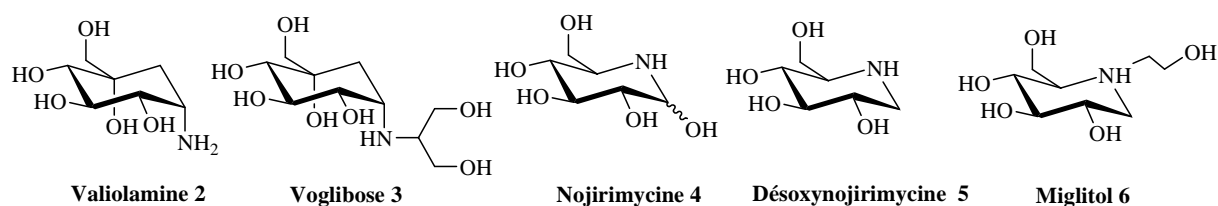


Figure 18

La nojirimycine **4** est un analogue azoté du D-glucose, isolée en 1967 de *Streptomyces nojiriensis*. Ce composé est un puissant inhibiteur d' α - et de β -glucosidases ($K_i = 0,13 \mu\text{M}$; saccharase d'intestin de lapin et $K_i = 70 \text{ nM}$; β -glucosidase d'*Aspergillus wentii*)²⁷. La désoxynojirimycine DNJ **5**, produit de la réduction de la nojirimycine **4** et aussi isolé d'une souche de *Streptomyces*, est un puissant inhibiteur d' α et de β -glucosidases ($K_i = 32 \text{ nM}$; saccharase d'intestin de lapin et $K_i = 60 \text{ nM}$; β -glucosidase d'*Aspergillus wentii*)²⁸. Malgré la bonne activité *in vitro* de la DNJ **5**, les tests *in vivo* ont été décevants. Ainsi un grand nombre de dérivés de la DNJ ont été préparés. Le miglitol **6** a été sélectionné, commercialisé en 1999 sous le nom Glyset[®] et fait partie de la seconde génération d'inhibiteur d' α -glycosidase ($\text{IC}_{50} = 0,19 \mu\text{M}$, saccharase d'intestin de rat).

Récemment, une nouvelle classe d'inhibiteur de glycosidases a été identifiée, le salacinol **6** et le kotalanol **7** (**Figure 19**). Ces composés ont été isolés des racines et tiges d'une plante²⁹ : *Salacia reticulata*, ou "Kotala himbutu" en Inde et au Sri Lanka. Dans ces pays, cette plante est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle pour traiter le diabète.

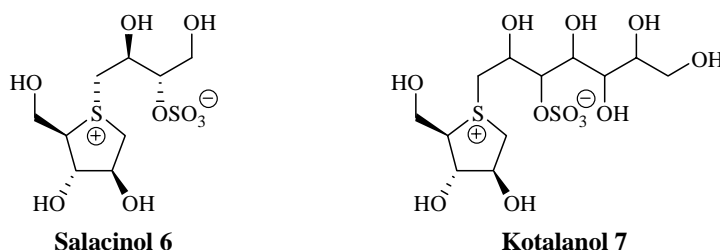


Figure 19

Ces molécules possèdent une structure zwitterionique inédite comprenant un cation sulfonium stabilisé par un anion sulfate. Le salacinol **6** et le kotalanol **7** sont des bons inhibiteurs d' α -glucosidases ($K_i = 0,93 \mu\text{M}$, $K_i = 0,54 \mu\text{M}$; maltase d'intestin grêle de rat).

II.1.2. Inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

Cette enzyme n'est pas une glycosidase, mais nous avons volontairement présenté ce paragraphe car il s'agit des mêmes familles d'inhibiteurs trouvés pour les glycosidases, de type pipéridines et pyrrolidine polyhydroxylées.

²⁷ Legler, G. ; Jülich, E. *Carbohydr. Res.* **1984**, 128, 61-72.

²⁸ Ekhardt, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

²⁹ Yoshikawa, M. ; Morakami, T. ; Shimada, H. ; Matsuda, H. ; Yamahara, J. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8367-7939.

Dans le diabète de type II, la production de glucose hépatique augmente. En inhibant la glycogène phosphorylase hépatique on pourrait aussi parvenir à baisser le taux de glucose dans le sang.

Le 1,4-didéoxy-1,4-imino-D-arabinitol (**D-AB1**) **8** (**Figure 20**), isolé en 1985 d'une plante, est un analogue de sucre sous forme furanique. C'est un bon inhibiteur de la glycogène phosphorylase hépatique *in vivo*. Il a aussi été testé sur des cellules hépatiques de rat³⁰, ces tests ont montré que c'est le meilleur inhibiteur de la glycogène phosphorylase avec un $IC_{50} = 1 \mu M$. Des alcaloïdes pipérinidiques ont aussi montré des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la glycogène phosphorylase. Par exemple, l'isofagomine **9** est un excellent inhibiteur avec un $IC_{50} = 0,7 \mu M$. Par contre la fagomine **10** c'est un inhibiteur modéré de cette enzyme ($IC_{50} = 200 \mu M$)³¹. Pour cette famille d'inhibiteur, cela illustre l'importance de la position pseudo-anomérique pour l'atome d'azote. Dans l'état de transition, la charge positive doit se localiser plutôt sur le carbone anomérique.

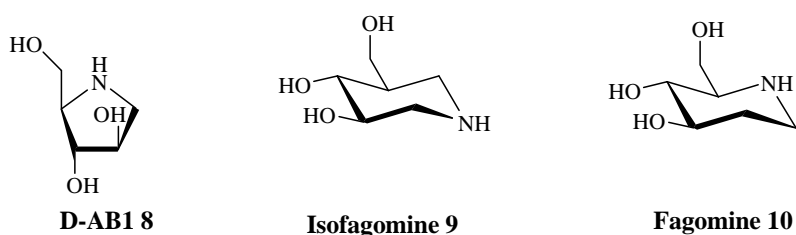


Figure 20

Des inhibiteurs de la glycogène phosphorylase pourraient être étudiés afin de développer de nouveaux médicaments pour traiter le diabète de type II. Il n'en existe pas encore sur le marché.

II.2. Agents antiviraux : Inhibiteurs d' α -glucosidases I

Les glycoprotéines des enveloppes virales sont souvent essentielles pour la sécrétion et/ou l'infection d'une cellule. Les composés qui interféreraient avec la biosynthèse de ces glycoprotéines sont des agents antiviraux potentiels. Cette biosynthèse a lieu dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

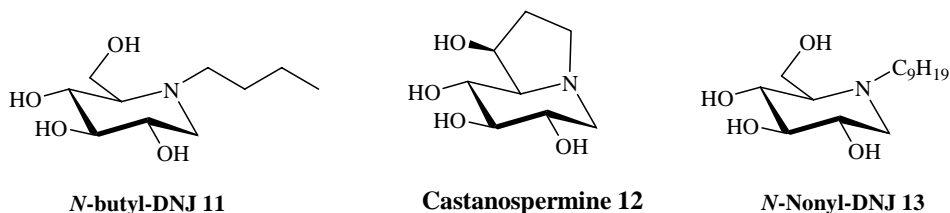


Figure 21

Il existe notamment des α -glucosidases et des α -mannosidases impliquées dans le processus de maturation des glycoprotéines.

³⁰ Anderson, B. ; Rassov, A. ; Westergaard, N. ; Lundgren, K. *Biochem. J.* **1999**, 342, 545-550.

³¹ Jakobsen, P. ; Lundbeck, J. M. ; Kristiansen, M. ; Breinholt, J. ; Demuth, H. ; Pawlas, J. ; Tores Candela, M. P. ; Anderson, B. ; Westergaard, N. ; Lundgren, K. ; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 733-744.

La DNJ **5** (**Figure 18**), la *N*-butyl-1-désoxynojirimycine (NB-DNJ) **11** et la castanospermine **12** sont des inhibiteurs de la réplication du virus d'immunodéficience humain (HIV) *in vitro*, mais ne sont pas aussi efficaces que d'autres produits utilisés anti VIH. Bien qu'ils soient spécifiques de l' α -glucosidase I, les tests *in vivo* n'ont pas été concluant et pour l'instant aucune de ces molécules n'a été mise sur le marché.

Un autre dérivé de la DNJ, la *N*-nonylDNJ **13** s'est révélée active pour inhiber les étapes de glycosylation nécessaires au transport du virus de l'hépatite B hors de la cellule hôte. Là non plus, les recherches n'ont pas encore donné lieu à la commercialisation d'un inhibiteur.

Jusqu'à présent, il n'a pas été vraiment montré dans la littérature que les inhibiteurs de glycosidases ont un réel potentiel thérapeutique en tant qu'antiviraux.

II.3. Agents thérapeutiques pour des maladies génétiques lysosomales

Les maladies génétiques héréditaires lysosomales sont liées à des mutations de la production de certaines enzymes, notamment des glycosidases, dans le lysosome. Les enzymes mutées ne pouvant pas remplir leur fonction provoquent l'accumulation de certains dérivés lipidiques (glycosphingolipides) ou autres substrats dans les cellules. Cela donne lieu à des désordres multiples graves sur différents organes du corps humain. Les maladies de Gaucher et de Fabry font partie de ces maladies héréditaires.

La maladie de Gaucher est la plus fréquente des maladies génétiques. Elle se caractérise par une diminution de la concentration de la glucocérébrosidase. Cette enzyme sert à former un lipide complexe dans le lysosome des monocytes et des macrophages. Son dysfonctionnement provoque un engorgement des lipides dans les cellules hépatiques, spléniques et la moelle osseuse.

La maladie de Fabry est un trouble héréditaire rare qui affecte plutôt les hommes. Elle se caractérise par une diminution de la concentration de l' α -galactosidase A. Cela provoque l'accumulation de globotriaoxylcéramide GB3, une substance lipidique.

Pour l'instant, en l'absence d'une thérapie génique efficace, et en raison du coût très élevé d'un traitement par enzymes de substitution, les inhibiteurs de glycosidases peuvent être utilisés pour traiter ces maladies génétiques.³² Pour illustrer ce paragraphe, nous ne développons que deux cibles, la céramide glucosyltransférase et les glycosidases du lysosome.

II.3.1. Inhibiteurs de la céramide glucosyltransférase

Les enzymes chargées de cataboliser les glycosphingolipides (GSL) étant déficientes, ces substrats s'accumulent sans fin. Leur accumulation dans le lysosome finit par déclencher des pathologies graves. S'il y avait un moyen de réduire la biosynthèse des GSL, on pourrait positivement diminuer la gravité et retarder l'apparition des symptômes de ces maladies. Cette stratégie thérapeutique est intitulée "suppression de substrat" ("substrate reduction" en anglais).

³² Butters, T.D. ; Dwek, R. A. ; Platt, F. M. *Glycobiology* **2005**, 43R-52R.

La céramide glucosyltransférase n'est pas une glycosidase, mais nous avons volontairement présenté ce paragraphe car il s'agit des mêmes familles d'inhibiteurs trouvés pour les glycosidases, de type pipéridines polyhydroxylées et aminocyclitols.

La céramide glucosyltransférase est indispensable pour la biosynthèse des GSL (en vert **figure 23**), c'est pourquoi elle est une cible de choix.

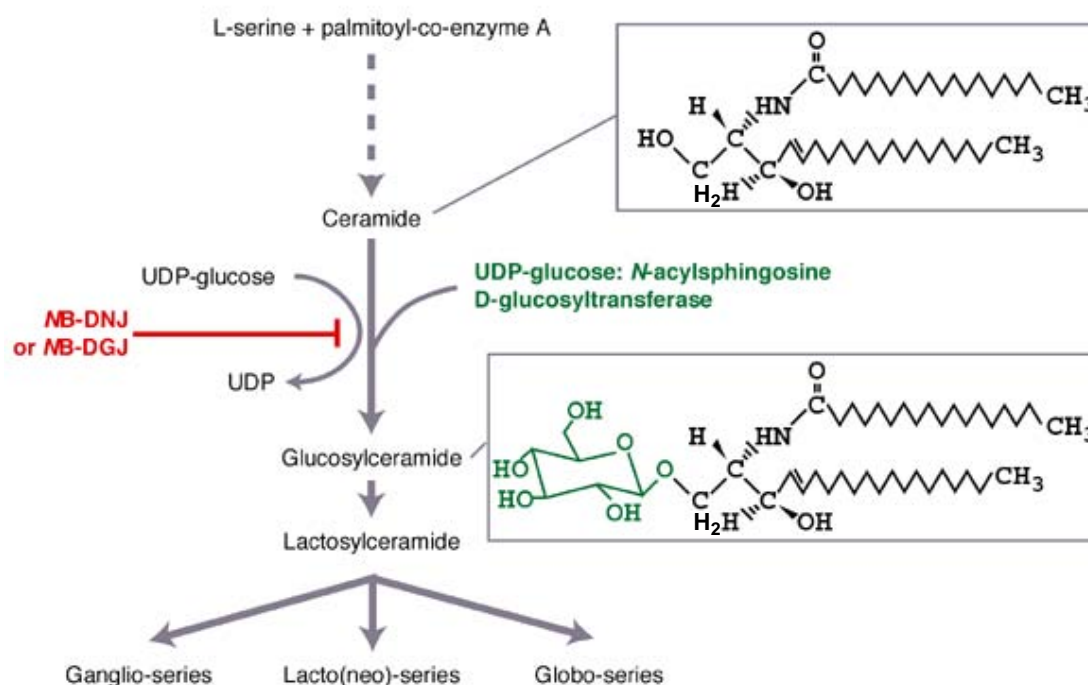


Figure 22

Biosynthèse des glycosphingolipides chez l'Homme

Il existe deux classes d'inhibiteurs de la biosynthèse des GSL, actif sur la maladie de Gaucher (déficience en β -glucocérébrosidase). Dans la première classe, on trouve des dérivés *N*-alkyle de la désoxygalactonojirimycine DGJ^{33,34} (**Figure 23**). La NB-DNJ (Zavesca[®]) (**Figure 21**) a été agréée pour traiter la maladie de Gaucher³⁵.

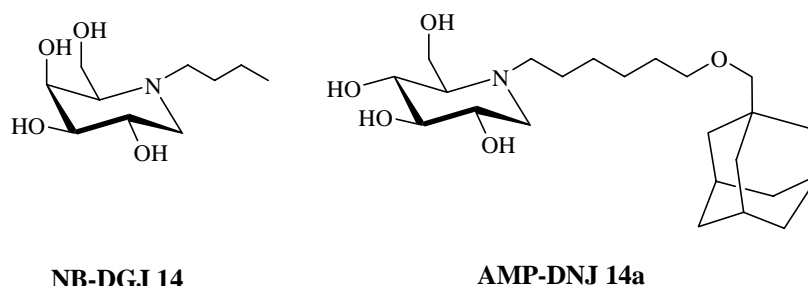


Figure 23

³³ Platt, F. M. ; Neises, G. B. ; Karlsson, G. B. ; Dwek, R. A. ; Butters, T. D. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27108.

³⁴ Overkleeft, H. S. ; Renkema, G. H. ; Neele, J. ; Vianello, P. ; Hung, I. O. ; Strijland, A. ; van der Burg, A. M. ; Koomen, G.-J. ; Pandit, U. K. ; Aerts, J. M. F. *J. J. Biol. Chem.* **1998**, 41, 26522-26527.

³⁵ Butters, T. D. ; Dwek, R. A. ; Platt, F. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 561.

Dans la deuxième classe, on trouve des composés plus proches des céramides, comme le *D-thréo*-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) **15** et le *D-thréo*-1-(3',4'-éthylènedioxy)phényl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (EtDO-P4) **16**.

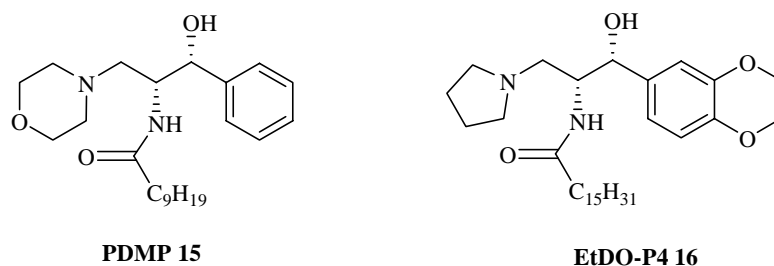


Figure 24

II.3.2. Inhibiteurs de glycosidases du lysosome

Les inhibiteurs de glycosidases peuvent être utilisés aussi comme des molécules chaperonnes pour traiter la maladie de Fabry. Des études ont montré que l' α -galactosidase A mutante forme des agrégats qui sont ensuite dégradés, mais son activité catalytique est proche de celle de l' α -galactosidase A normale. L'enzyme mutée est incapable d'être évacuée du RE, n'étant pas glycosylée normalement. Le rôle du chaperon est de donner à l'enzyme mutée une conformation proche de l'état naturel (sans mutation) qui a pour conséquence d'être reconnue et la maturation de la protéine est ainsi poursuivie.

L'inhibition de cette enzyme par les molécules présentées dans la **Figure 25** permet en fait de faciliter le transport de l'enzyme du RE vers l'appareil de Golgi, pour atteindre ensuite le lysosome. Afin d'améliorer l'activité de la DGJ **17** ($IC_{50} = 0,04 \mu M$, α -galactosidase A), des dérivés ont été synthétisés et testés, l' α -homogalactonojirimycine (HGJ)³⁶ **18** ($IC_{50} = 0,21 \mu M$, α -galactosidase A), l' α -homoallonojirimycine (HAJ)³⁷ **19** ($IC_{50} = 4,3 \mu M$, α -galactosidase A) et le β -1-C-butyl-DGJ (CB-DGJ)³⁸ **20** ($IC_{50} = 16 \mu M$, α -galactosidase A). Ces dérivés se sont avérés moins inhibiteur que la DGJ **17**.

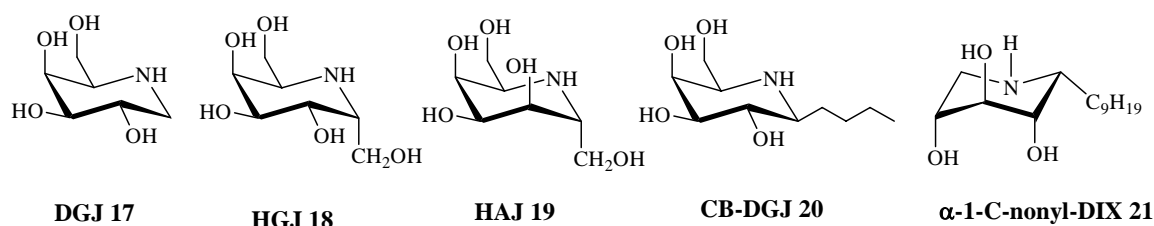


Figure 25

³⁶ Martin, O. R. ; Xie, F. ; Liu, L. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4027-4030.

³⁷ Asano, N. ; Nishida, M. ; Kizu, H. ; Matsui, K. ; Watson, A. A. ; Nash, R. J. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 98.

³⁸ Ikeda, K. ; Takahashi, M. ; Nishida, M. ; Miyauchi, M. ; Kizu, H. ; Kameda, Y. ; Arisawa, M. ; Watson, A. A. ; Nash, R. J. ; Fleet, G. W. J. ; Asano, N. *Carbohydr. Res.* **2000**, 323, 73-80.

Très récemment, Martin et coll. ont préparé plusieurs analogues de la NB-DNJ **11**.³⁹ Les tests *in vitro* ont montré que le dérivé α -1-C-nonyl-DIX **21** (l' α -1-C-nonyl-1,5-didéoxy-1,5-imino-D-xylitol) est un meilleur inhibiteur de la β -glucocérébrosidase avec un K_i de 2,2 nM. C'est un très bon candidat pour le développement de molécules chaperonnes pour traiter la maladie de Gaucher.

Des structures de type aminocyclitols⁴⁰ ont aussi été développées dans le cadre de cette stratégie de molécules chaperonnes ciblant d'autres maladies génétiques (**Figure 26**).

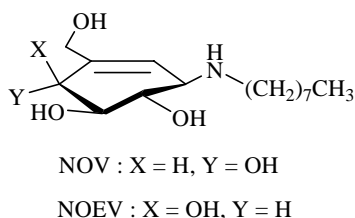


Figure 26

La *N*-octylvaliénamine (*N*-octyl-[(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)]-1-amino-5-(hydroxyméthyl)cyclohex-5-ène-2,3,4-triol]) (NOV) est un inhibiteur de la β -glucosidase (glucocérébrosidase) et la *N*-octylépivaliénamine (NOEV) est un inhibiteur de la β -galactosidase humaine ($IC_{50} = 0,2 \mu M$)⁴¹. Cette dernière amine est une nouvelle candidate sérieuse pour le traitement de plusieurs maladies génétiques.

³⁹ Compain, P. ; Martin, O. R. ; Boucheron, C. ; Godin, G. ; Yu, L. ; Ikeda, K. ; Asano, N. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1356.

⁴⁰ Lin, H. ; Sigumoto, Y. ; Ninomya, H. ; Oka, A. ; Taniguchi, M. ; Ida, H. ; Eto, Y. ; Ogawa, S. ; Matsuzaki, Y. ; Sawa, M. ; Inoue, T. ; Higaki, K. ; Nanba, E. ; Ohno, K. ; Suzuki, Y. *Biochem. Biophys. Acta* **2004**, 1689, 219.

⁴¹ Ogawa, S. ; Matsunga, Y. K. ; Suzuki, Y. *Biorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1967.

***CHAPITRE II :
LES AMINOCYCLITOLS ET LEURS PROPRIETES
BIOLOGIQUES***

Afin de mieux situer les objectifs de cette thèse dans le paysage scientifique, nous allons décrire de façon non exhaustive quelques méthodes de préparation d'aminocyclitols dont les activités biologiques ont été évaluées.

Depuis l'isolement par voie microbiologique de la valiénamine et de ses analogues, plusieurs synthèses ont été développées. Certaines concernent des produits sous forme racémiques ou en mélange de diastéréoisomères^{42,43,44}, d'autres des produits optiquement actifs⁴⁵. Nous décrirons entre autres les synthèses permettant de préparer la valiénamine et ses analogues naturels et non naturels avec une bonne pureté optique.

I. Méthodes chimiques de synthèse des aminocyclitols

Deux grandes stratégies de synthèse des aminocyclitols sont apparues dans la littérature : l'une est basée sur l'utilisation d'un synthon linéaire impliquant une cyclisation intramoléculaire, l'autre est construite sur l'emploi d'un carbocycle déjà formé.

I.1. Formation des carbocycles

La majorité des synthèses existant actuellement est construite sur l'emploi de sucres comme source chirale abondante ou de produits naturels.

I.1.1. A partir du D-glucose

L'utilisation du D-glucose nécessite une étape clé de formation du carbocycle et l'introduction d'un carbone supplémentaire s'il s'agit de la valiénamine ou un analogue.

➤ La lactone **22** obtenue à partir du D-glucose, a été utilisée par Horri *et al.*^{46,47} pour la synthèse de la valiénamine **28** et la valiolamine **2** (**Schéma 1**). L'addition de diméthylméthylphosphonate de lithium ou de diméthylsulfone de lithium permet d'introduire un atome de carbone. Ensuite, l'étape clef, une réaction intramoléculaire de type Horner-Emmons pour le composé **26** suivie d'une réduction et d'une SN a donné le composé **27**. De la même façon, le dérivé soufré **25** a donné le composé **28**. Une réaction de type Mitsunobu a permis d'introduire l'amine avec inversion de configuration. Ainsi la valiénamine et la valiolamine ont été obtenues avec un rendement global de 15% en dix étapes.

⁴² Rasso, G. ; Auzas, L. ; Pinna, L. ; Zanardi, F. ; Battistini, L. ; Casiraghi, G. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1213.

⁴³ Ogawa, S. ; Toyokuni, T. ; Suami, T. *Chem. Lett.* **1980**, 713.

⁴⁴ Ogawa, S. ; Chida, N. ; Toyokuni, T. ; Suami, T. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1203.

⁴⁵ Chen, X. ; Fan, Y. ; Zheng, Y. ; Shen, Y. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1955-1977.

⁴⁶ Fukase, H. ; Horri, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3651-3658.

⁴⁷ Horri, S. *Takeda Kenkyusho Ho.* **1993**, *52*, 1.

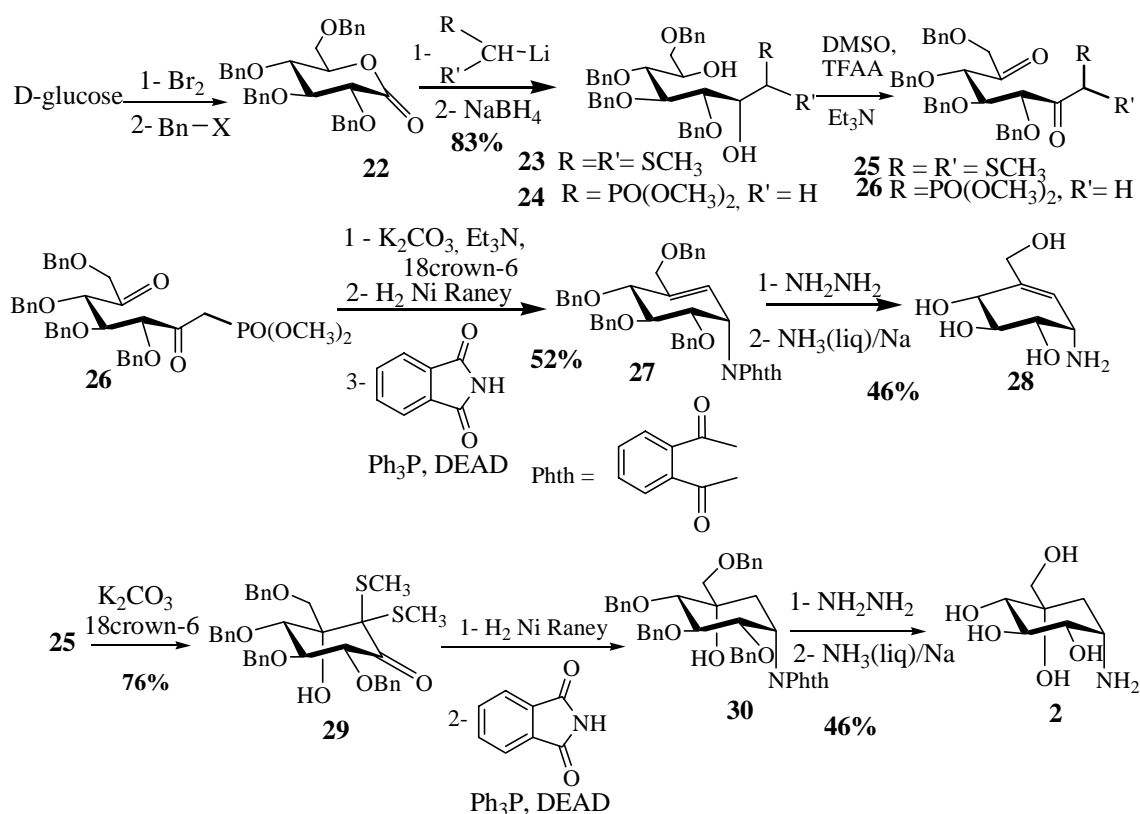


Schéma 1

➤ En 2005, Shang et coll⁴⁸ ont publié une synthèse de la valiénamine à partir du 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (**Schéma 2**).

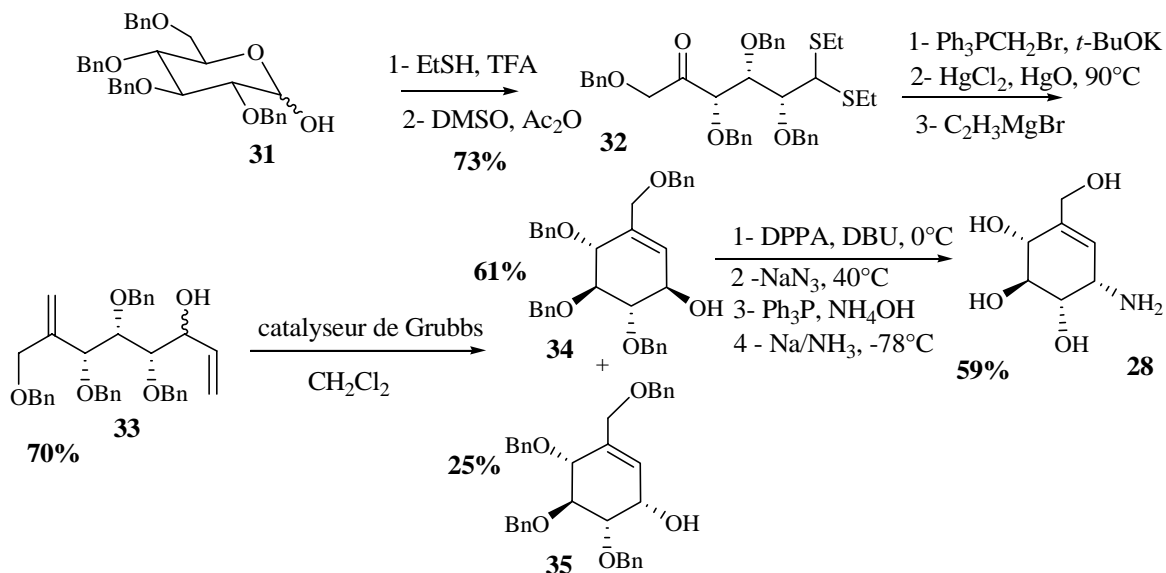


Schéma 2

⁴⁸ Chang, Y. -K. ; Lee, B. -Y. ; Kim, D. J. ; Lee, G. S. ; Jeon, H. B. ; Kim, K. S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3299.

L'étape clé de cette synthèse est une réaction de métathèse avec formation d'un cycle à partir du composé **33**, qui donne un mélange de deux épimères. Les deux épimères **34** et **35** ont été séparés par chromatographie. Le rendement global de cette réaction est de 14% sur 9 étapes.

➤ Yoshikawa et coll⁴⁹ ont synthétisé la validamine **40** par l'intermédiaire d'un dérivé nitrofurano **36**, préparé à partir du D-glucose (**Schéma 3**).

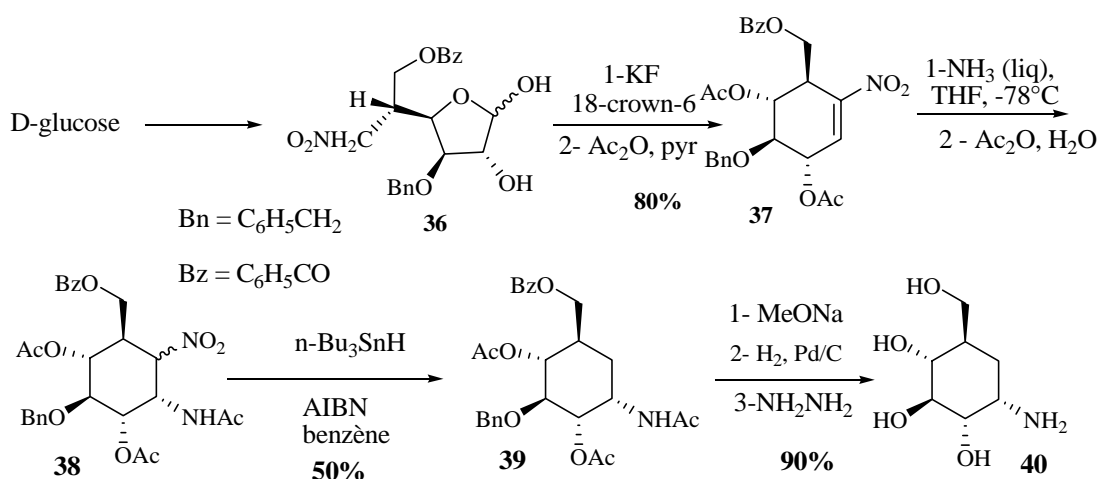


Schéma 3

Le nitrocyclitol **37** est formé grâce à une réaction de Henry intramoléculaire (nitroaldolisation). Une addition de type Michael permet ensuite d'introduire la fonction amine de manière stéréosélective. Le groupement nitro est éliminé par réduction radicalaire et après déprotection, la validamine a été isolée avec un rendement de 32% en 8 étapes à partir du composé **36**.

Cette même équipe a publiée en 1994⁵⁰ une autre synthèse de la validamine à partir du D-glucose, en modifiant les premières étapes (**Schéma 4**).

La lactone **42** a été obtenue après une réaction de Henry stéréosélective et l'action de l'éthylvinyléther en présence d'acide camphorsulfonique (ACS). Le traitement de **42** par NaBH₄ a permis l'élimination du groupement éthoxyéthoxyle donnant l'oléfine **43** qui est réduite in situ en même temps que la fonction lactone. Le cyclitol **46** est formé grâce à une réaction de Henry intramoléculaire en présence de fluorure de césium. Ensuite, on retrouve le même enchainement de réactions que dans le schéma 3. Ainsi la validamine **40** a été isolée avec un rendement de 6% en 13 étapes.

⁴⁹ Yoshikawa, M. ; Cha, B. C. ; Ochaichi, Y. ; Takinami, Y. ; Yokokawa, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4236.

⁵⁰ Yoshikawa, M. ; Murakami, N. ; Yokokawa, Y. ; Inoue, Y. ; Kuroda, Y. ; Kitagawa, I. *Tetrahedron* **1994**, 50, 9619-9628.

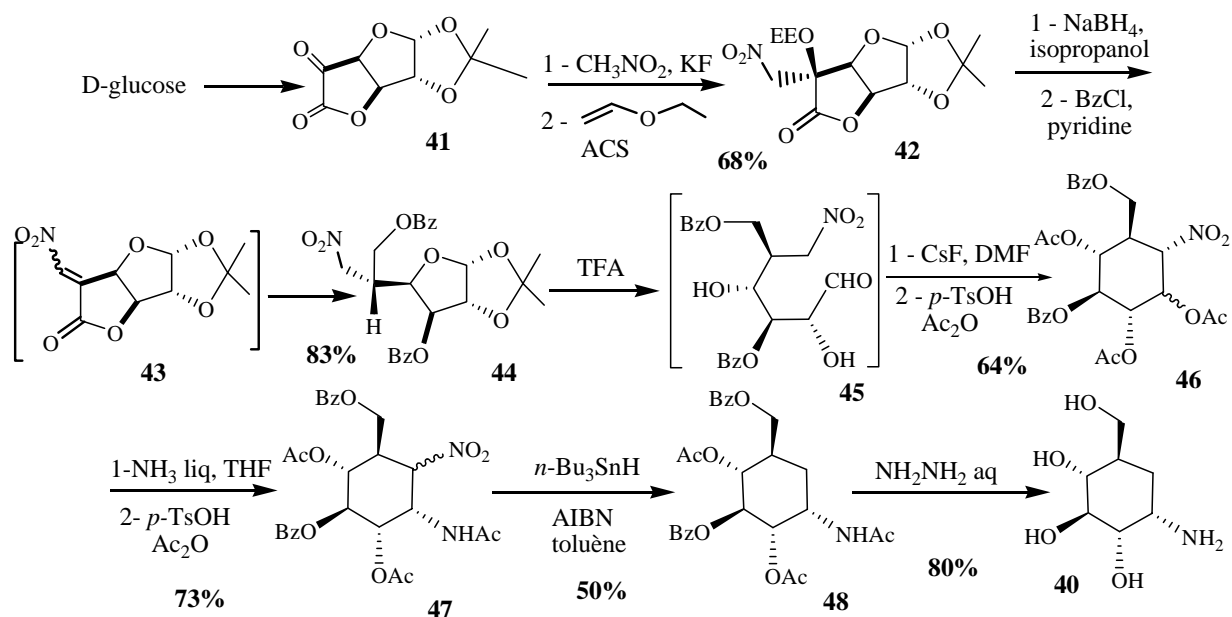


Schéma 4

Selon la même méthodologie, cette équipe a synthétisé la valiénamine **28** en passant par le nitrocyclitol **49** (Schéma 5), lui-même préparé à partir du D-glucose. La double liaison a été introduite par une réaction d'élimination.⁴⁹

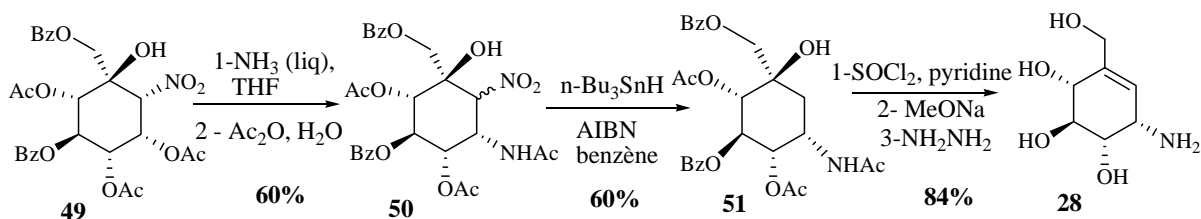


Schéma 5

I.1.2. A partir du D-xylose

Comme dans le cas du D-glucose, l'utilisation du xylose nécessite l'introduction de carbones supplémentaires ainsi qu'une étape clé de formation du carbocycle.

En 2000, Tatsuta *et al.*⁵¹ ont synthétisé la valiénamine et la validamine (Schéma 6), l'étape clé de cette synthèse étant la condensation aldolique de la sulfone **54** pour former le cycle. Une réaction de Mitsunobu permet d'introduire la future fonction amine.

⁴⁹ Yoshikawa, M. ; Cha, B. C. ; Ochaichi, Y. ; Takinami, Y. ; Yokokawa, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4236.

⁵¹ Tatsuta, K. ; Mukai, H. ; Takahashi, M. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 430.

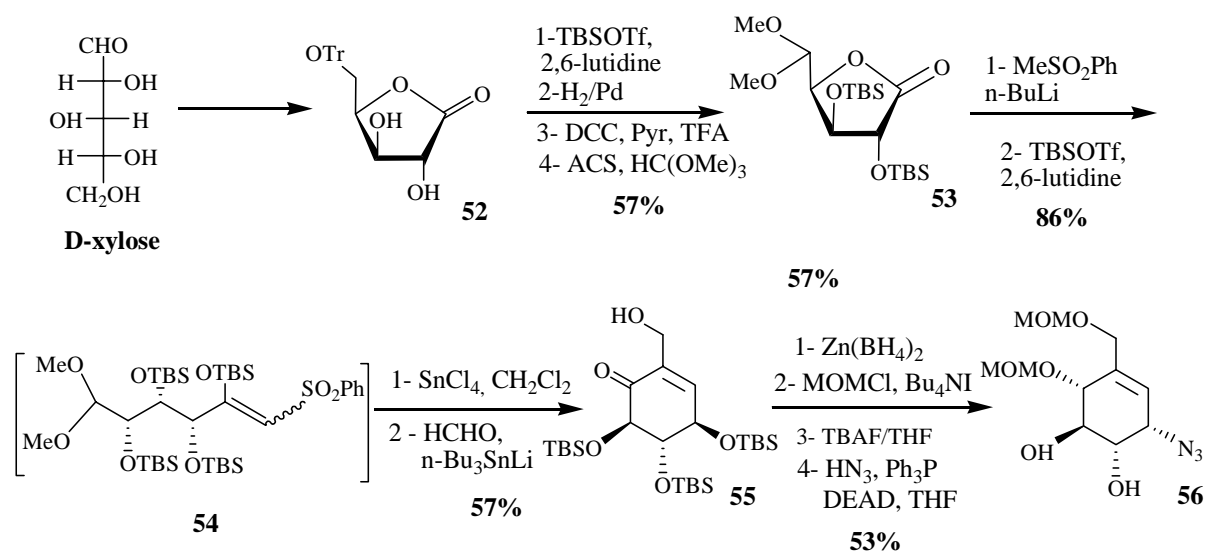


Schéma 6

On obtient la valiénamine **28** (Schéma 7) après une hydrogénation et une hydrolyse acide de l'intermédiaire **56**. Une protection des groupements hydroxyles du composé **56** rigidifiant l'ensemble de la molécule a permis l'hydrogénation stéréosélective de la double liaison de l'intermédiaire **58**. **59** est ensuite déprotégé pour donner la validamine **40**.

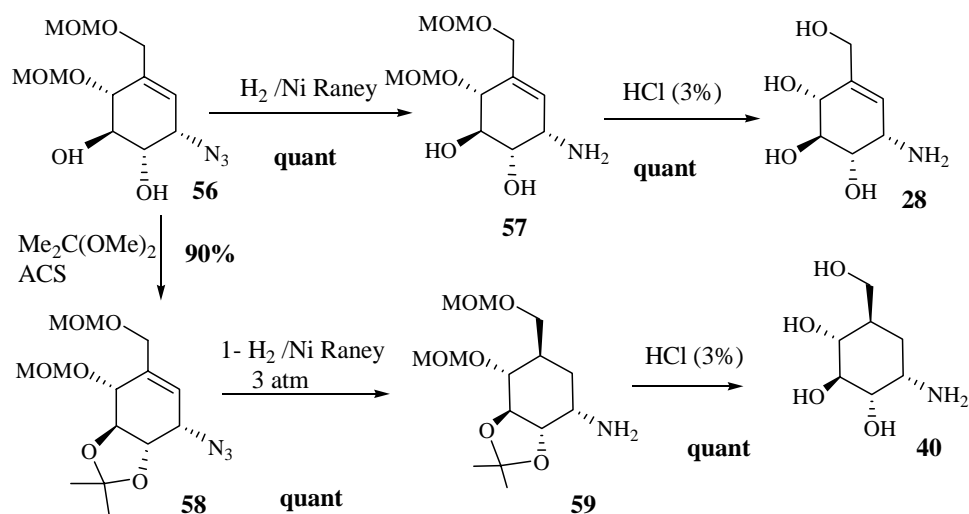


Schéma 7

La synthèse de la valiénamine **28** a été réalisée en 15 étapes avec un rendement global de 15% et celle de la validamine **40** en 16 étapes avec un rendement global de 14%.

I.1.3. À partir du D-mannitol

En s'inspirant de la structure du voglibose **3**, Le Merrer et coll ont préparé quelques aminocyclitols à partir des dérivés du D-mannitol⁵² (Schéma 8). L'étape clef de cette synthèse est l'ouverture du diépoxyde **65** par une dialkylation selon un réarrangement de

⁵² Gravier-Pelletier, C. ; Maton, W. ; Dintiger, T. ; Tellier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8705-8720.

Brook⁵³. Deux carbocycles sont isolés **61** (*L-ido*) et **62** avec les rendements respectifs 15% et 72%.

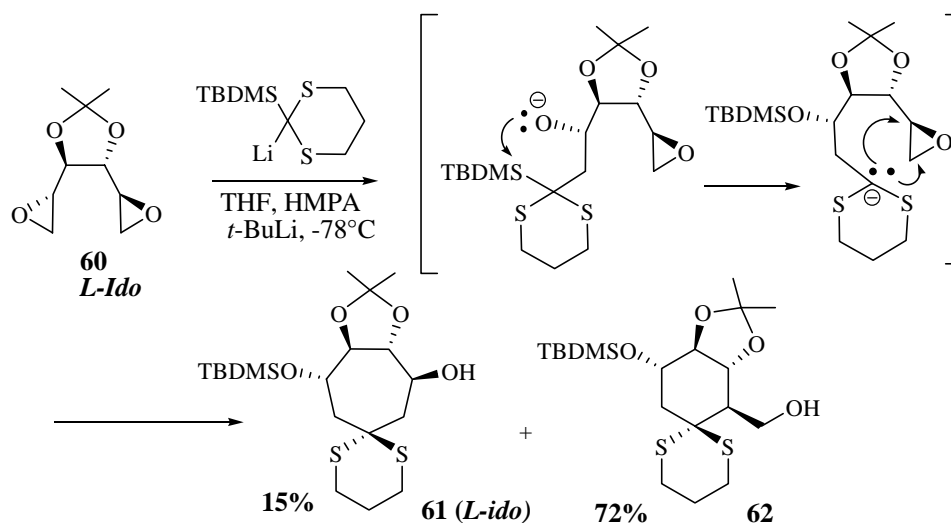


Schéma 8

Ensuite, le dérivé **63**, provenant de **62**, a été déprotégé par action du *N*-bromosuccinimide. Les aminocyclitols **65** et **65a** ont été obtenus par une amination réductive de la cétone **64** en présence de tétraisopropyloxyde de titane et d'ammoniac. Cette réaction n'est pas stéréosélective, les deux configurations sont obtenues pour l'amine. Des dérivés *N*-alkylés **66** et **66a** ont été formés de la même façon

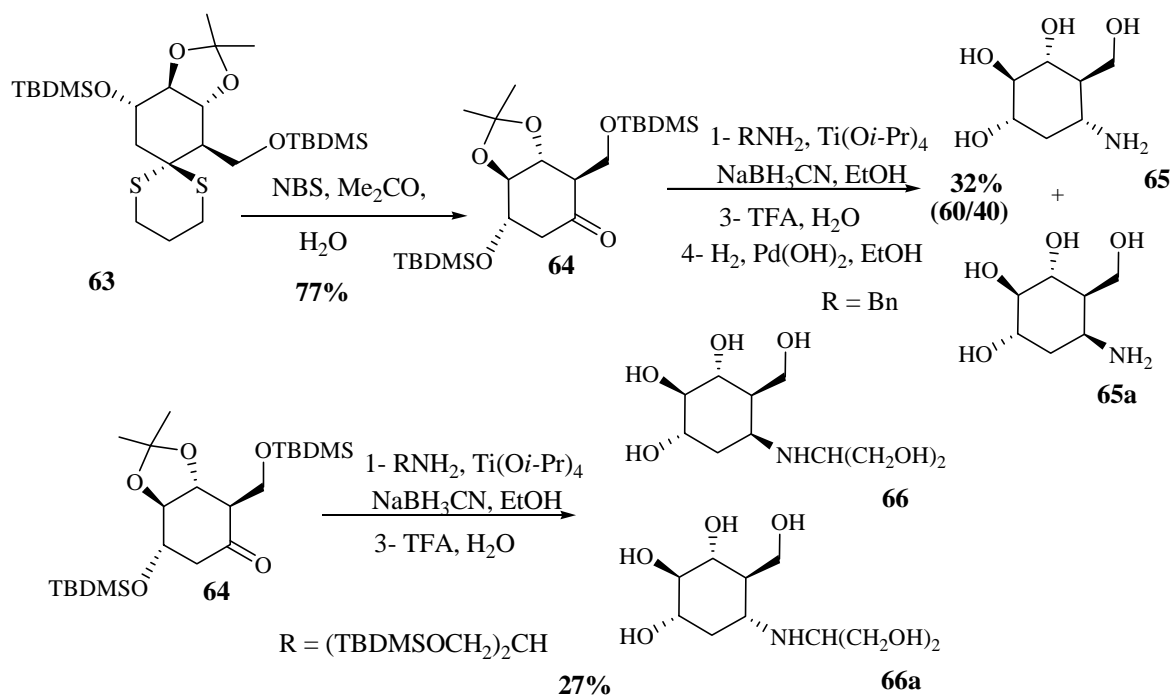


Schéma 9

⁵³ Tietze, L. F. ; Geissler, H. ; Gewert, J. A. ; Jakobi, U. *Synlett*, **1994**, 551.

Les auteurs ont aussi synthétisé l'équivalent de **61** et **62** en série *D-manno* à partir du diépoxyde correspond (exemple non représenté dans le schéma 9).

I.2. Synthèses à partir de produits possédant un carbocycle

I.2.1. A partir de l'acide quinique

En utilisant de l'acide quinique **67**, le carbocycle est déjà formé. En contrepartie, il est nécessaire d'introduire un autre hydroxyle et d'inverser certaines configurations. Pour cela de nombreuses étapes de protection et déprotection sont nécessaires.

➤ Extrait de l'écorce d'arbre *Cinchona*, l'acide quinique **67** constitue le produit de départ d'un grand nombre de synthèses de molécules chirales. En 1995, l'équipe de Shing a publié une synthèse de la validamine⁵⁴ **40** (Schéma 10). L'étape clé de cette synthèse est une ouverture régiosélective du sulfate cyclique **68** par LiN_3 suivie d'une inversion de configuration en remplaçant l'acétate du composé **69** par un triflate pour obtenir un bon groupe partant. La validamine a été isolée avec un rendement global de 1% en 15 étapes.

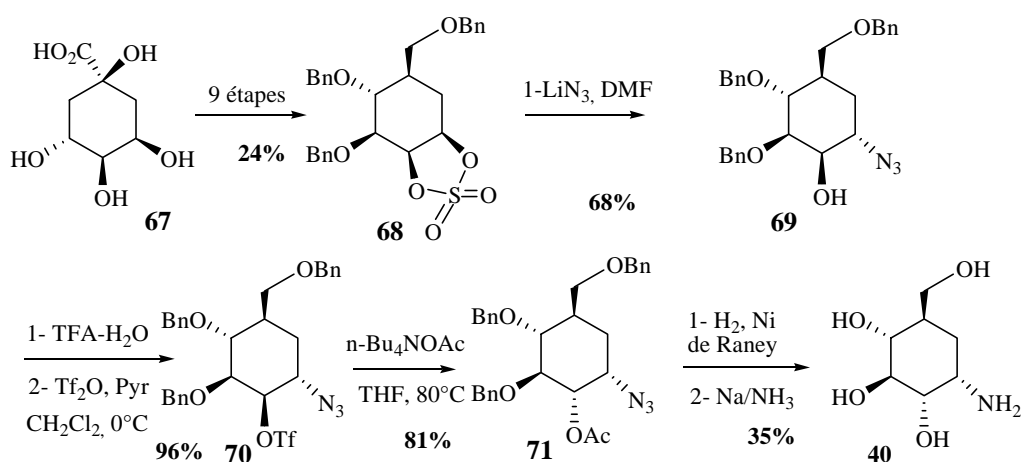


Schéma 10

➤ En 1996, cette équipe a également publié la synthèse de la valioline⁵⁵ (Schéma 11).

⁵⁴ Shing, T. K. M.; Tai, V. W. –F. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5332.

⁵⁵ Shing, T. K. M.; Tam, E. K. Wong. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8468.

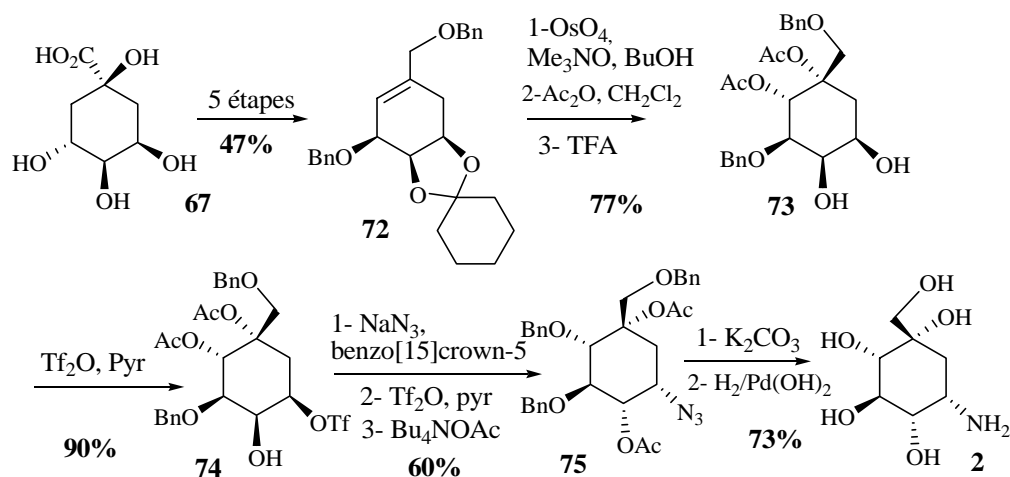


Schéma 11

La double liaison de **72** est dihydroxylée puis les alcools sont protégés. L'amine est introduite par $\text{S}_{\text{N}}2$ et réduction du groupe azido après une série de protection-déprotection. La valioline est obtenue avec un rendement global de 8% en 14 étapes.

1.2.2. A partir du *myo*-inositol

➤ Sureshan et coll⁵⁶ ont préparé l'aminocyclitol **79** et le diaminocyclitol **82** à partir du *myo*-inositol protégé **76** (Schéma 12).

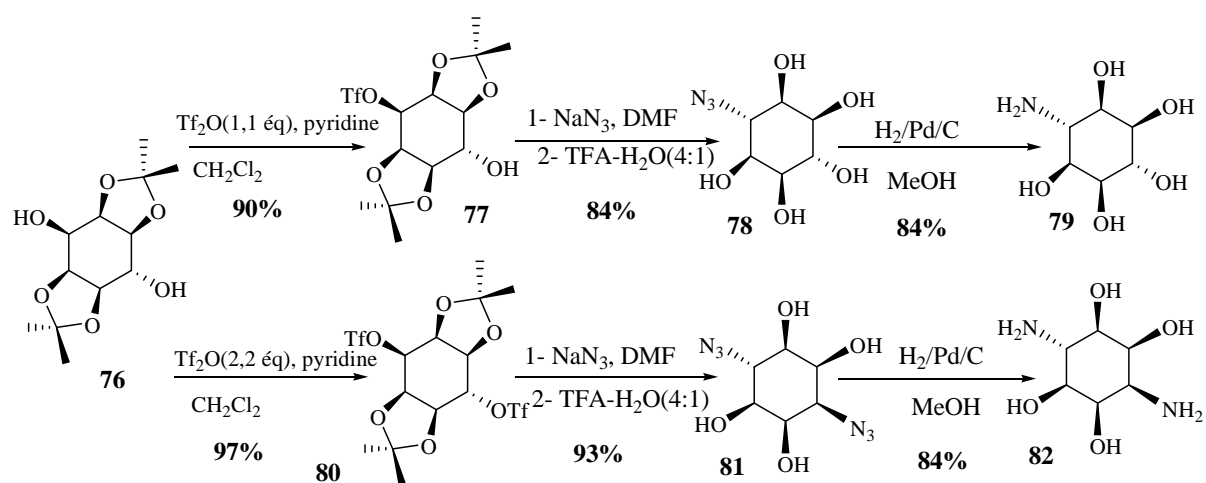


Schéma 12

L'un des deux hydroxyles de **76** est activé par un triflate pour la substitution par N_3^- . Après réduction et déprotection, l'amine **79** est isolée.

En utilisant deux équivalents d'anhydride triflique au départ, la diamine **82** peut être préparée de la même façon.

⁵⁶ Sureshan, K. M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Watanabe, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 8367.

➤ Ogawa *et al.*⁵⁷ ont synthétisé l'aminocyclitol **88** inhibiteur potentiel de l' α -fucosidase en partant du (-)-*vibo*-quercitol **83**, préparé par bioconversion du *myo*-inositol par une bactérie (Schéma 13)⁵⁸.

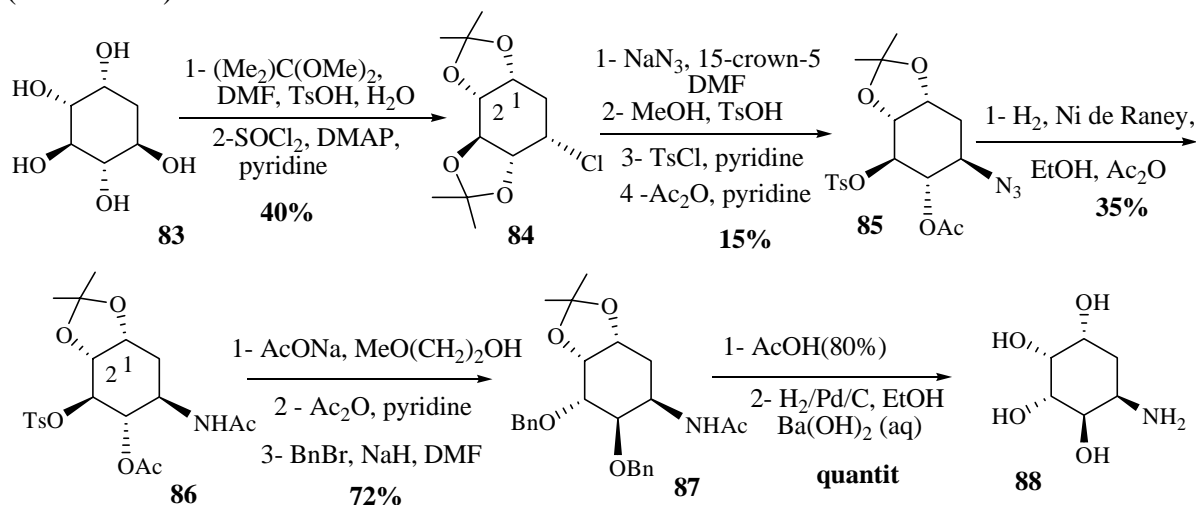


Schéma 13

Les fonctions hydroxyles du (-)-*vibo*-quercitol **83** ont été protégées sélectivement. La fonction amine a été introduite par une S_N2 , après inversion de configuration du carbone 5, suivie d'une réduction. Les configurations des carbones 3 et 4 du dérivé **85** ont été inversées en traitant par l'acétate de sodium dans 2-méthoxyéthanol.

I.2.3. A partir de divers carbocycles

➤ Le dérivé du 7-norbornanone **92**, préparé à partir du tétracyclopentadiène **89** (Schéma 14)⁵⁹, a été utilisé par Mehta *et al* pour synthétiser de nouveaux aminocyclitols⁶⁰ (Schéma 15).

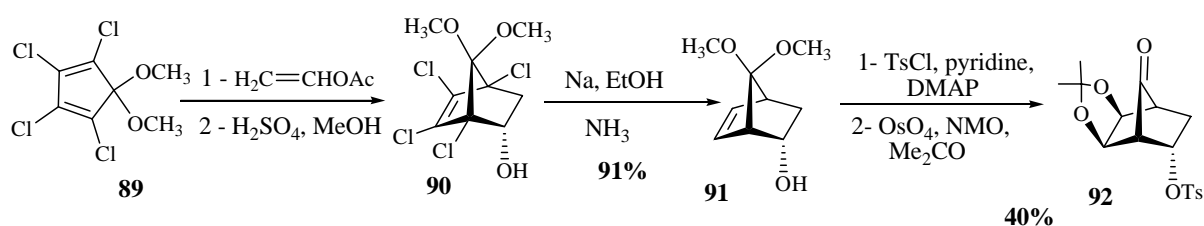


Schéma 14

Une cycloaddition de type Diels-Alder a permis la formation du carbocycle **90**. Les chlores ont été éliminés par réduction et le diol protégé a été obtenu après une dihydroxylation suivie d'une protection.

L'amine **95** a été isolée après une oxydation régiosélective de type Baeyer-Villiger du dérivé **92**. La fonction amine a été introduite par une S_N2 suivie d'une réduction.

⁵⁷ Ogawa, S. ; Asada, M. ; Ooki, Y. ; Mori, M. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4306.

⁵⁸ Ogawa, S. ; Uetsuki, S. ; Tezuka, Y. ; Morikawa, T. ; Takahashi, A. ; Sato, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1493.

⁵⁹ Mehta, G. ; Mohal, N. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3285.

⁶⁰ Mehta, G. ; Lakshminath, S. ; Talukdar, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 335-338.

Le composé **92** traité dans des conditions basiques permet de préparer l'intermédiaire **96**. Ce dernier est le point de départ pour la préparation de l'aminocyclitol **100**. L'aminohydroxylation est l'étape clef pour accéder à **100**.

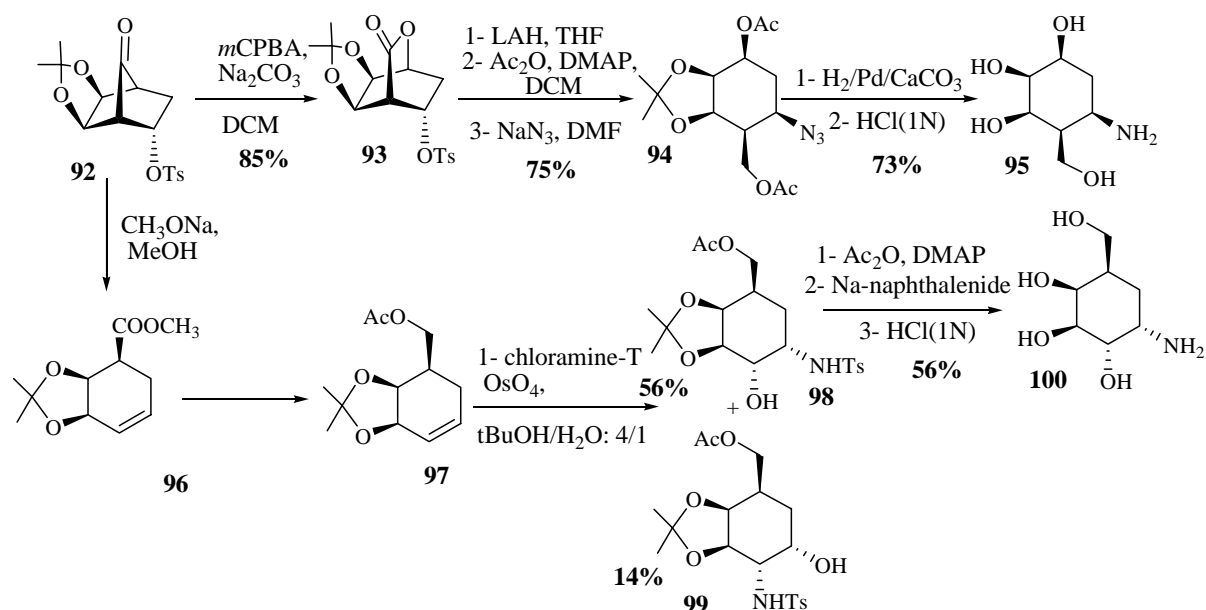


Schéma 15

A partir du dérivé **92** et selon la même stratégie de synthèse cette équipe a synthétisé d'autres aminocyclitols (Schéma 16).

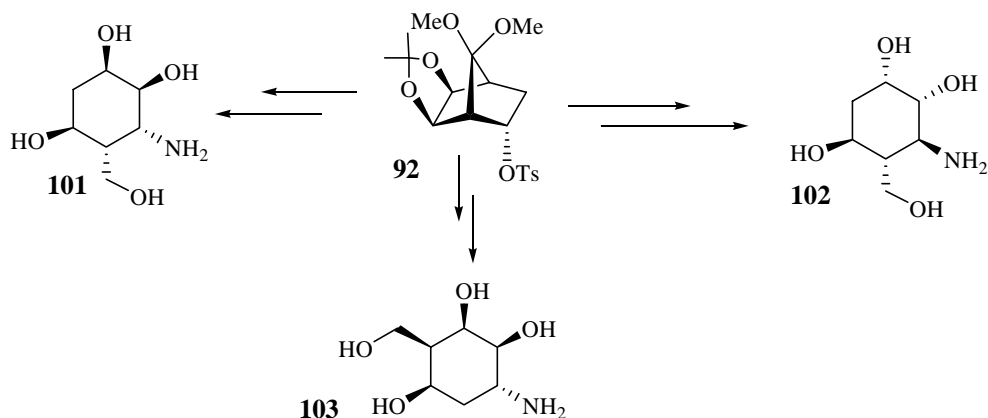


Schéma 16

➤ Depuis de nombreuses années, Ogawa et coll ont développé une méthodologie de synthèse d'aminocyclitols basée sur l'utilisation du carbocycle racémique **107** (Schéma 17). Cet intermédiaire clef est préparé par réaction de Diels-Alder entre le furane et l'acrylate d'éthyle⁶¹.

La réaction de Diels Alder a permis la formation du dérivé cyclique **104**. Le traitement en milieu basique puis par l'eau oxygénée a donné la lactone **105**. Celle-ci est ensuite réduite et

⁶¹ Ogawa, S. ; Nakamoto, K. ; Takahara, M. ; Tanno, Y. ; Chida, N. ; Suami, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1176.

acétylée en **106**. L'acide bromhydrique a ouvert l'étheroxyde pour donner le carbocycle racémique **107**.

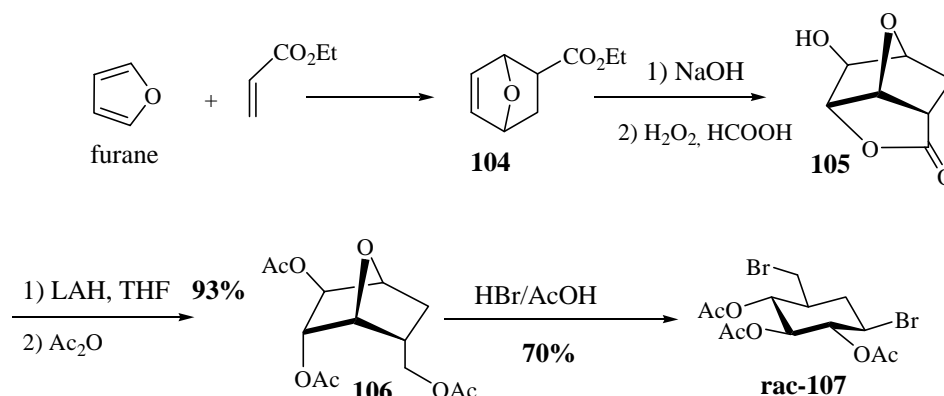


Schéma 17

Les intermédiaires **108**, **110** et **111**, eux-mêmes formés à partir du carbocycle **107**, ont été utilisés comme produits de départ pour synthétiser plusieurs aminocyclitol (Schéma 18). De toutes ces stratégies, en découlent de nombreux résultats décrits dans la littérature.⁶² Nous n'illustrerons pas tous les articles, nous avons simplement choisi deux exemples: **L-109** et **rac-β-épivaliénamine**.^{63,64}

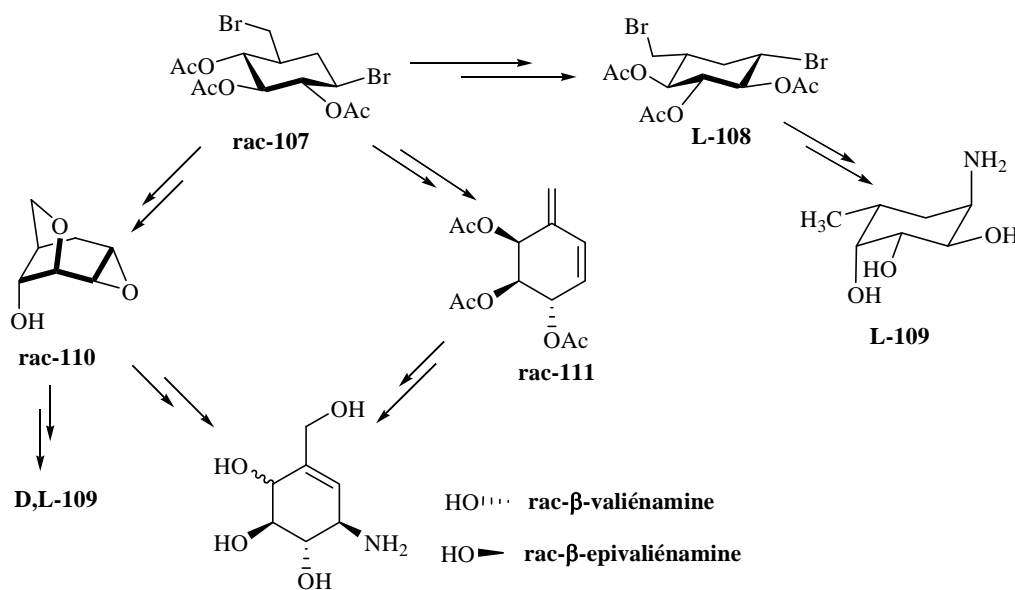


Schéma 18

⁶² a) Ogawa, S. ; Funayama, S. ; Okazaki, K. ; Ishizuka, F. ; Sakata, Y. ; Doi, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5183-5188. b) Ogawa, S. ; Watanabe, M. ; Maruyama, A. ; Hisamatsu, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 749-752. c) Ogawa, S. ; Mori, M. ; Takeuchi, G. ; Doi, F. ; Watanabe, M. ; Sakata, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2811-2814. d) Ogawa, S. ; Sekura, R. ; Maruyama, A. ; Yuasa, H. ; Hashimoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2089-2093.

⁶³ Ogawa, S. ; Maruyama, A. ; Odagiri, T. ; Yuasa, H. ; Hashimoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 967-974.

⁶⁴ Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Ito, N. ; Watanabe, M. ; Kabawam, K. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 995-1002.

Dans le premier exemple, cette équipe s'était intéressée au dédoublement de son précurseur **107**⁶⁵ lui permettant de synthétiser **L-108**, produit de départ de la synthèse de **L-109** (Schéma 19).

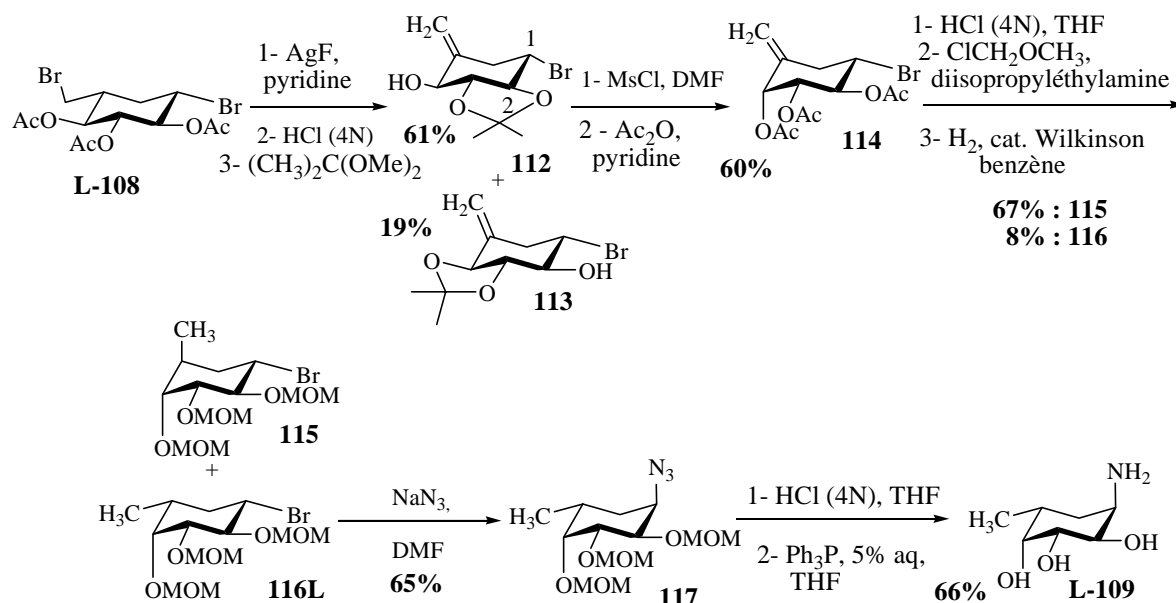


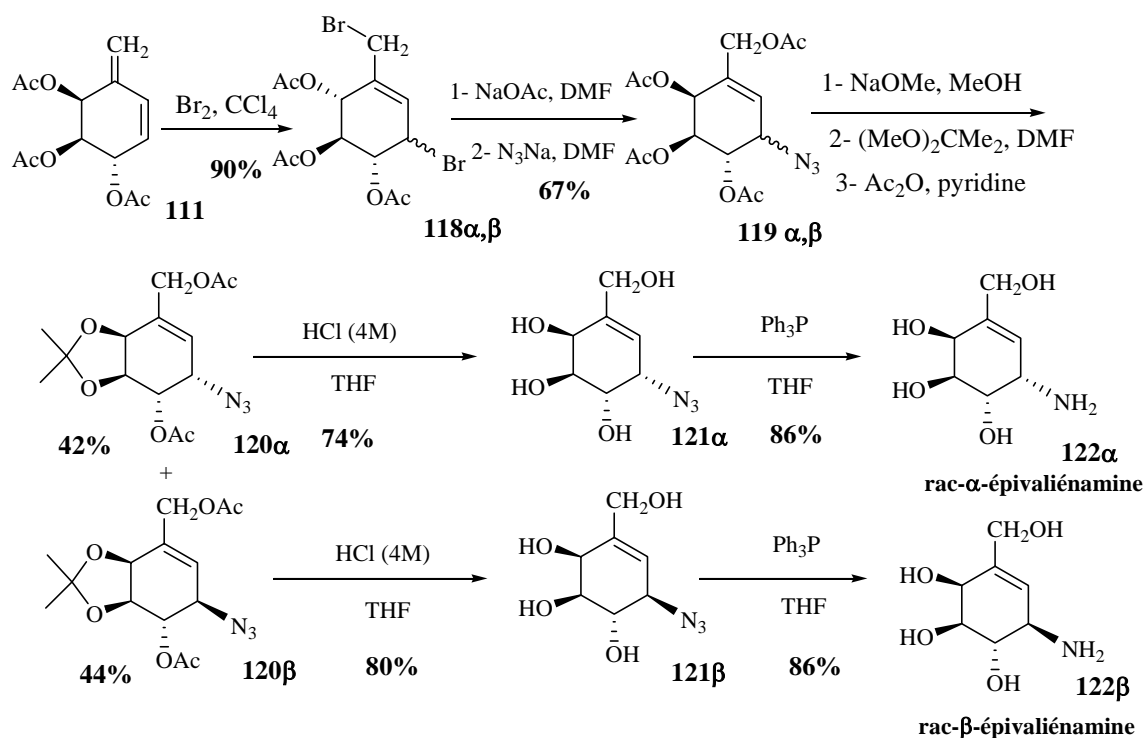
Schéma 19

L'inversion de configuration en C4 a été réalisée après une méthylation de l'intermédiaire **112** suivie d'une substitution nucléophile. Les hydroxyles sont ensuite déprotégés et reprotégés par des méthoxyméthyles. L'hydrogénation sélective de l'alcène en présence du catalyseur de Wilkinson a donné majoritairement le stéréoisomère **115** ainsi que le composé désiré **116L**. Ce dernier est traité par de l'azoture de sodium, puis déprotégé et réduit. Le dérivé *L-fuco* **109** est obtenu, il s'agit d'un inhibiteur potentiel de fucosidases.

Dans le deuxième exemple, Ogawa et coll ont synthétisé un autre intermédiaire **rac-111** à partir de **rac-107**⁶⁴. L'étape clé de cette synthèse est une addition 1,4 du dibrome sur **111** (Schéma 20). Cette réaction n'est pas stéréosélective, les deux configurations sont retrouvées pour le carbone asymétrique qui est créé. Les bromes sont substitués sélectivement par de l'acétate puis par l'azoture. Les esters sont hydrolysés et les alcools formés protégés de nouveau soit par un acétal soit par un acétate. C'est sous la forme acétonide que les deux stéréoisomères ont enfin pu être séparés. Les deux voies parallèles de déprotection et réduction de l'azido ont permis d'isoler **122 α** et **β**. Ces aminocyclitols sont des inhibiteurs potentiels de l'α et β-galactosidase.

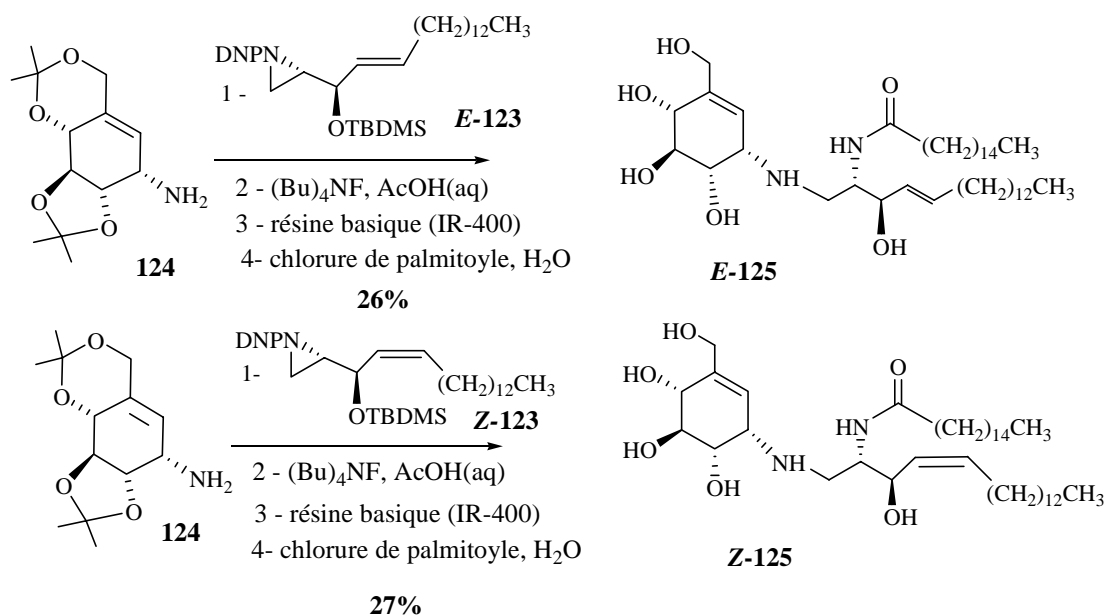
⁶⁵ Ogawa, S. ; Iwasawa, Y. ; Nose, T. ; Suami, T. ; Ohba, S. ; Ito, M. ; Saito, Y. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **1985**, 903-906.

⁶⁴ Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Ito, N. ; Watanabe, M. ; Kabawam, K. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 995-1002.



I.3. N-alkylation des aminocyclitols

➤ Avec l'objectif de développer des inhibiteurs de la biosynthèse des glycosylcéramides, Tsunoda et al⁶⁶ ont couplé la valiénamine avec des analogues de céramides naturels. La valiénamine protégée **124** a été couplée avec les aziridines **E-123** et **Z-123**. Celles-ci ont été préparées à partir du di-*O*-isopropylidène- α -D-glucofuranose⁶⁷.



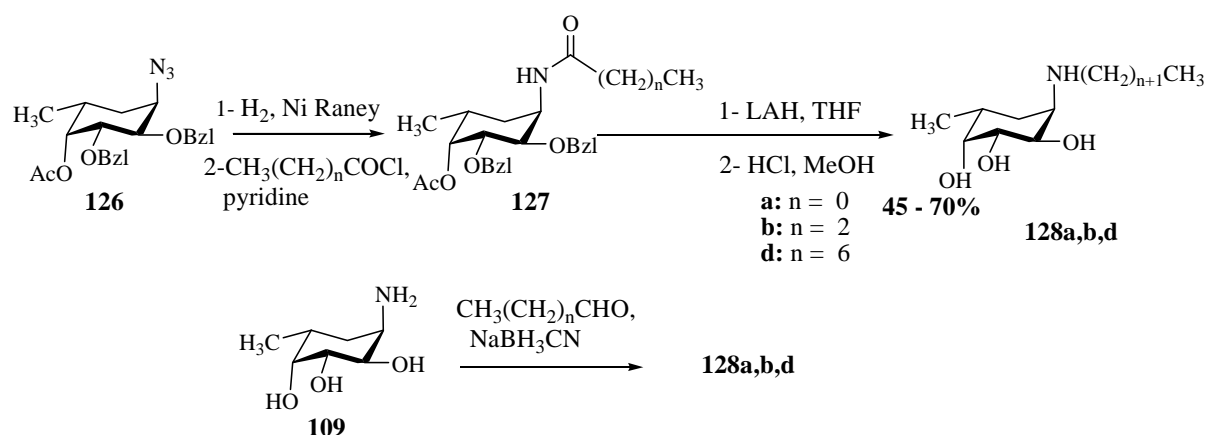
⁶⁶ Tsunoda, H. ; Inokuchi, J.-i. ; Yamagishi, K. ; Ogawa, S. *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 279.

⁶⁷ Koike, M. ; Numata, M. ; Sugimoto, M. ; Nakamura, Y. ; Ogawa, S. *Carbohydr. Res.* **1986**, 158, 113-121.

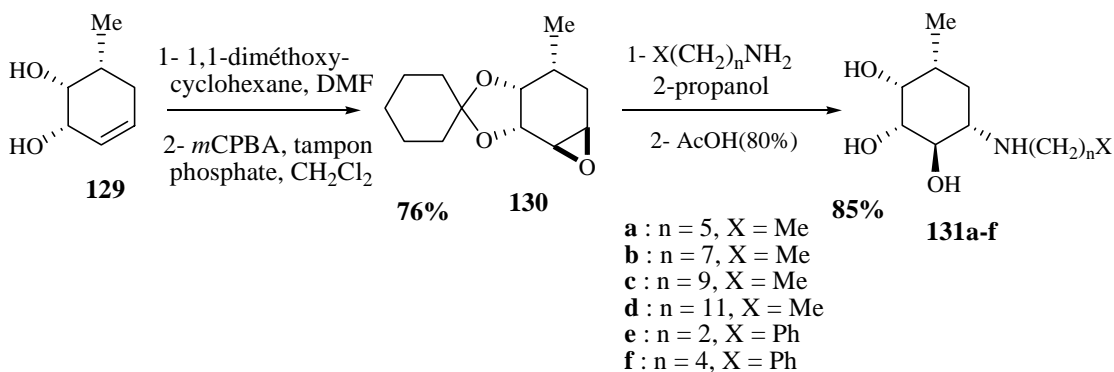
Après le couplage, les intermédiaires sont déprotégés et l'amine primaire libre est alkylée par le chlorure de palmytoyle. Les deux isomères *Z* et *E* analogues de céramide **E-125** et **Z-125** ont été obtenus respectivement avec des rendements de 27 et 26%.

➤ Pour étudier l'effet de la *N*-alkylation de leurs amines sur l'inhibition, Ogawa et coll ont synthétisé plusieurs dérivés *N*-alkylés ou *N*-phénylalkylés (**Schéma 22**) du fucopyranosylamine **109** racémique (**Schéma 19**) ou l'un de ses précurseurs **126**.^{62c}

Les groupements alkyles ont été introduits soit à partir de **126** par réaction avec un chlorure d'acide suivie d'une réduction de l'amide formé, soit directement par couplage entre l'amine **109** et différents aldéhydes en milieu réducteur.



➤ Le dérivé **129**, préparé à partir du carbocycle **107** (**Schéma 18**), a été utilisé pour préparer des dérivés *N*-alkylés inhibiteurs potentiels de l' α -fucosidase⁶⁸ (**Schéma 23**)



L'étape clef de cette synthèse est une époxydation sélective par action de l'acide *m*-chloroperbenzoïque, suivie de l'ouverture régiosélective de l'époxyde par les différentes alkylamines et phénylalkylamines.

^{62c} Ogawa, S. ; Mori, M. ; Takeuchi, G. ; Doi, F. ; Watanabe, M. ; Sakata, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2811.

⁶⁸ Ogawa, S. ; Fujieda, S. ; Sakata, Y. ; Ishizaki, M. ; Hisamatsu, S. ; Okazaki, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3461-3463.

➤ Avec le but d'étudier l'influence de la *N*-alkylation sur l'inhibition de la β -galactosidase, quelques dérivés *N*-alkylés de l'amine **122b** (epivaliénamine, "galacto") ont été synthétisés (**Schéma 24**)⁶⁴. Selon une stratégie proche de celle développée dans le **Schéma 20** pour la synthèse des amines **122**, ces aminocyclitols *N*-alkylés ont été obtenus finalement par substitution nucléophile du brome du dérivé **134a**, par les amines. Réalisée sur **134b**, cette substitution a donné les mêmes dérivés que **134a** grâce à l'assistance du groupement acétyle en position 2 qui forme un cation acétylium intermédiaire.

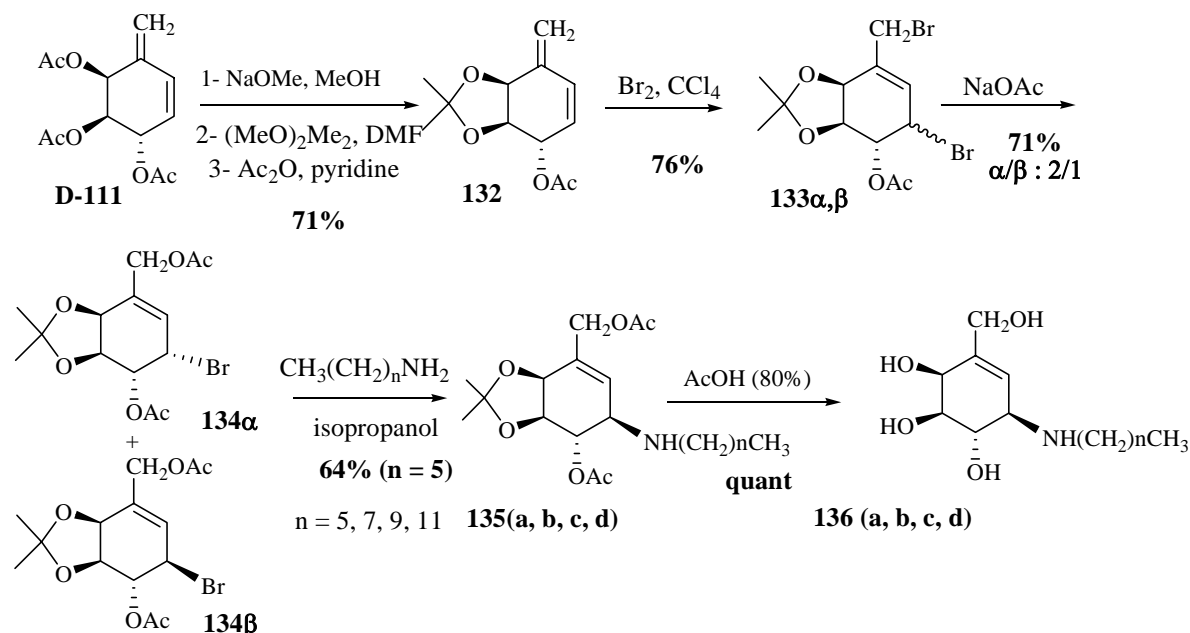


Schéma 24

II. Synthèse des aminocyclitols par voie microbiologique

II.1. Dégradation microbienne de la validamicyne A

La valiénamine a été isolé pour la première fois dans les années 70, après dégradation microbienne de la validamicyne A (**Figure 27**) avec *Pseudomonas denitrificans*^{69,70}.

La première étape de cette dégradation est l'hydrolyse de la validamicyne A **137**, donnant le D-glucose et la validoxylamine A **138**. Celle-ci est transformée ensuite en valiénamine **28** et validamine **40**.

⁶⁴ Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Ito, N. ; Watanabe, M. ; Kabawam, K. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 995-1002.

⁶⁹ Kameda, Y. ; Horri, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 746.

⁷⁰ Kameda, Y. ; Horri, S. ; Yamano, T. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 298.

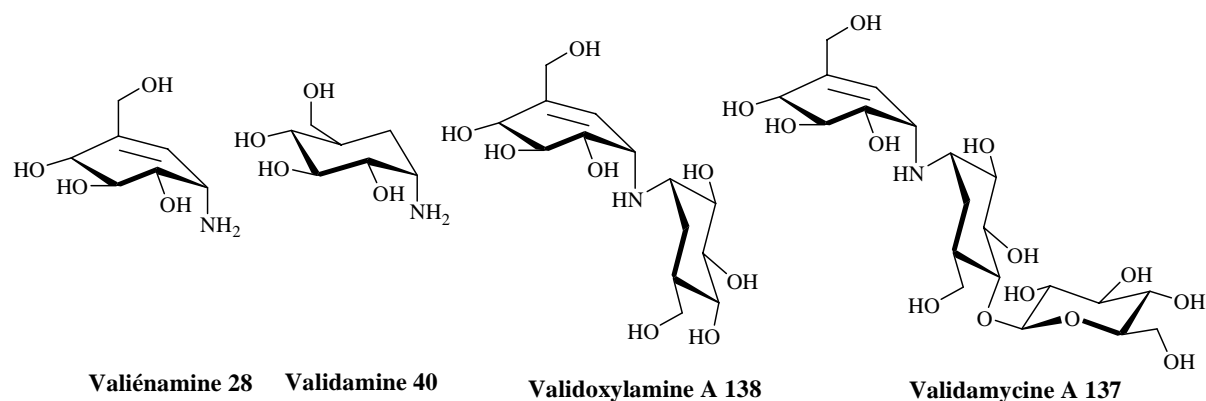


Figure 27

De la même façon, *Flavobacterium saccharophilum*,^{71,72} a montré une grande efficacité en dégradant la validoxylamine A **138** pour donner la valiénamine **28** et la validamine **40**.

Les auteurs de ces travaux, Asano *et al*⁷³, ont étudié de plus près cette biodégradation par *Flavobacterium saccharophilum* et ont proposé la voie présentée dans le **Schéma 25**. La première étape est une hydrolyse de la liaison glycosidique, libérant le D-glucose et la validoxylamine A **138**. La validoxylamine est ensuite oxydée sur l'une ou l'autre des positions indiquées dans le schéma. Cette oxydation permet d'activer l'hydrogène en position 2 et la molécule peut ainsi subir une élimination pour donner la valiénamine **28** ou la validamine **40**.

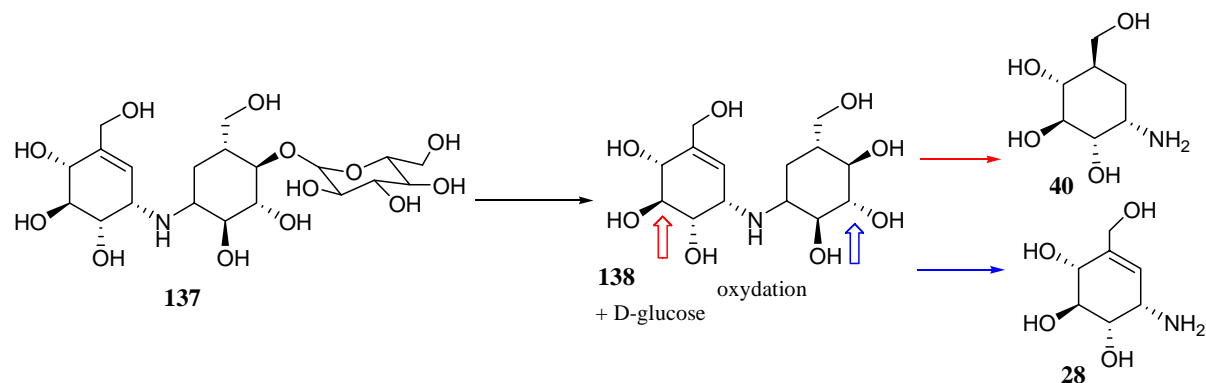


Schéma 25

Des études plus récentes^{74,75} portant sur la biosynthèse de la validamycine A, ont montré que la valiénamine **28**, la valioline **2**, la validamine **40** et l'hydroxyvalidamine **139** sont présentes dans le milieu de culture (**Figure 28**).

⁷¹ Kameda, Y. ; Asano, N., Teranishi, M. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 1573.

⁷² Kameda, Y. ; Asano, N., Teranishi, M. ; Yoshokawa, M. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 1573.

⁷³ Asano, N., Takeuchi, Ninomiya, K., Kameda, Y. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1984**, 37, 859.

⁷⁴ Mahmud, T. ; Xu, J. ; Choi, Y. U. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5066.

⁷⁵ Dong, H. ; Mahmud, T. ; Tornus, I. ; Lee, S. ; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2733.

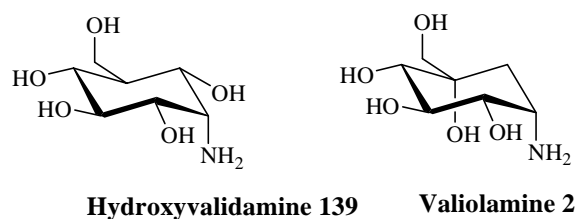


Figure 28

Et malheureusement, les différents produits obtenus en petites quantités, sous forme d'un mélange, sont difficiles à séparer.

II.2. Dégradation microbienne de l'acarbose

En 2005, Chen *et al*⁷⁶ ont développé une nouvelle méthode de production de la valiénamine par dégradation microbienne de l'acarbose (**Figure 17**) avec *Stenotrophomonas maltophilia*. L'avantage de cette méthode par rapport aux précédentes, est que la valiénamine est isolée seule avec un rendement de 60%.

III. Propriétés inhibitrices des différents aminocyclitols

Nous avons choisi de présenter les propriétés inhibitrices des différents aminocyclitols selon leurs applications. Nous ne ferons pas non plus une revue exhaustive sur ce domaine, seuls quelques aminocyclitols qui ont montré des propriétés biologiques intéressantes débouchant sur des applications thérapeutiques seront présentés et commentés.

Depuis la découverte des métabolites naturels tels l'acarbose et tous ses analogues, les aminocyclitols ont trouvé de nombreuses applications en tant qu'agents antidiabétiques ou outils d'étude de cette maladie. En revanche, ils sont peu étudiés en tant qu'agents antiviraux. Plus récemment, des recherches très prometteuses impliquant ces carbocycles ont été engagées pour traiter des maladies génétiques lysosomales.

III.1. Agents antidiabétiques

De façon générale et en lien avec le premier inhibiteur de glycosidase qui a été commercialisé (acarbose), les aminocyclitols ont été principalement testés en tant qu'inhibiteurs d' α -glucosidases intestinales.

La valiénamine étant une sous-structure de l'acarbose, dans ce paragraphe il ne sera pas étonnant d'y trouver cette molécule ainsi que des analogues proches comme la validamine, la valioline etc.

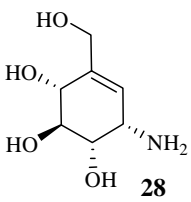
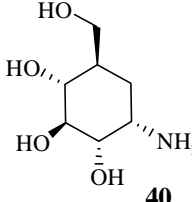
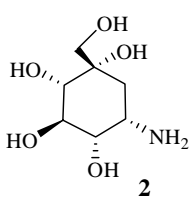
La valiénamine **28** est un pseudo-sucre du D-glucose, elle a été testée pour la première fois en 1980 par Y. Kameda *et al.* sur quelques glucosides hydrolases.⁷⁷ Elle s'est révélée inhibiteur compétitif et spécifique de l' α -glucosidase de levure de boulanger ($IC_{50} = 170 \mu M$).

⁷⁶ Chen, X. ; Zheng, Y. ; Shen, Y. *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21, 1002-1003.

⁷⁷ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 1575.

En 1984, cette même équipe a isolé la valioline et des analogues et testé ces produits sur quelques glycosidases intestinales, bactériennes ou végétales.²⁸ Tous les aminocyclitols ont montré une meilleure activité sur les enzymes d'origine animale.

Dans le **Tableau 1**, sont présentées les valeurs de K_i obtenues avec deux α -glucosidases de porc. Ils ont constaté que la valioline **2** est la plus puissante ($K_i = 30$ nM et 350 nM). La valioline **28** est un inhibiteur d' α -glucosidases intestinales ($K_i = 50$ μ M). C'est un peu surprenant, car sans la double liaison la valioline ne mime plus la conformation de l'ion oxocarbénium et ce n'est pas la sous-structure retrouvée dans l'acarbose pourtant lui aussi très inhibiteur de ces enzymes. Ces aminocyclitols agissent comme des analogues de l'état de transition ($K_i \ll K_m$).

Inhibiteur / K_i en μ M	 28	 40	 2
glucosidase (saccharase de porc)	50	2,3	0,03
glucosidase (maltase de porc)	180	23	0,35

$k_m = 2300$ μ M (maltose) ; 3000 μ M (saccharose)

Tableau 1

Un grand nombre de dérivés *N*-substitués de la valioline **2** a été synthétisé en 1986 par Horri *et al*⁷⁸. Les meilleurs inhibiteurs parmi ces dérivés sont présentés dans le **Tableau 2**.

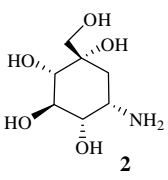
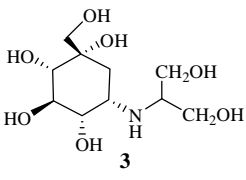
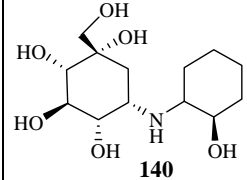
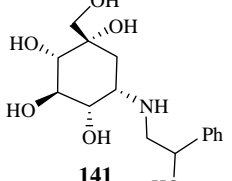
Enzyme	IC ₅₀ en nM			
	 2	 3	 140	 141
Maltase de porc	220	15	6,1	5,8
Saccharase de porc	49	4,6	5,2	2,9

Tableau 2

²⁸ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Takeuchi, M. ; Yamaguchi, T. ; Matsui, K. ; Horri, S. ; Fukase, H. *J. Antibiot.* **1984**, 37, 1301.

⁷⁸ Horri, S. ; Fuhase, H. ; Matsuo, T. ; Kameda, Y. ; Asano, N. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1038-1046.

Parmi les meilleurs inhibiteurs d' α -glucosidases, on trouve la *N*-(2-hydroxycyclohexyl)valiolamine **140** (IC_{50} = 6,1 nM, maltase de porc et IC_{50} = 5,2 nM, saccharose de porc), la *N*-(β -hydroxyphényl)valiolamine **141** (IC_{50} = 5,8 nM, maltase de porc et IC_{50} = 2,9 nM, saccharose de porc). Le voglibose **3** est aussi un excellent inhibiteur d' α -glucosidases (IC_{50} = 15 nM, maltase de porc et IC_{50} = 4,6 nM, saccharose de porc). Il est actuellement commercialisé en Asie par la société Takeda sous le nom Basen® pour traiter le diabète de type II.

Ces dérivés *N*-substitués de la valioline ont un potentiel d'inhibition nettement meilleur que celui de la valioline **2**. Ce qui peut être expliqué par le fait que ces analogues bisubstitués permettent l'occupation des deux sites de l'enzyme, la partie valioline occupe le site catalytique de l'enzyme et la chaîne alkylée occupe le site de l'aglycone.

De même, les dérivés *N*-substitués de la valioline, de pseudodisaccharide sont inhibiteurs d' α -glucosidases (**Figure 29**). En effet la *N*-(4,6-dideoxy- α -glucopyranosyl)valioline **142**, est un très bon inhibiteur d' α -glucosidases intestinales (IC_{50} = 4,9 nM, maltase de porc et IC_{50} = 10 nM, saccharase de porc). La *N*-(2,3,4-trihydroxycyclohexyl)valioline **143** est excellent inhibiteur d' α -glucosidases intestinales (IC_{50} = 68 μ M, maltase de porc et IC_{50} = 36 nM, saccharase de porc).

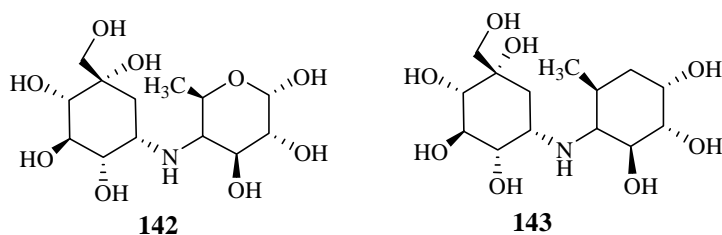


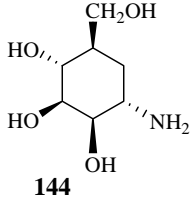
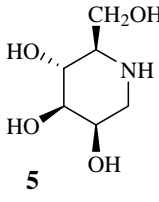
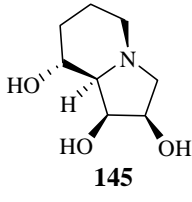
Figure 29

III.2. Agents antiviraux

Dans ce domaine, les cibles sont des glycosidases intervenant dans la maturation des glycoprotéines. Les inhibiteurs sont en général des inhibiteurs de l' α -mannosidase et la β -glucosidase du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

La manno-validamine **144**⁷⁹, préparée à partir de la validamine **40** a été testée sur des α -mannosidases de foie de souris. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec la désoxymannojirimycine **5** et la swainsonine **145** (**Tableau 3**)

⁷⁹ Kameda, Y. ; Kawashima, K. ; Takeushi, M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Matsui, K. *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 259-264.

inhibiteur	IC ₅₀ (K _i) en μM		
			
α-mannosidase (RE)	8 (1,2)	NI	30
α-mannosidase IA (Golgi)	34 (28)	28	NI
α-mannosidase II (Golgi)	30 (28)	74	0,02
α-mannosidase (lysosome)	24 (17)	640	0,036

RE : réticulum endoplasmique ; NI : non inhibiteur (IC₅₀ > 2000 μM)

Tableau 3

La manno-validamine **144** est un inhibiteur compétitif de l' α-mannosidase (RE) (K_i = 1,2 μM), de l' α-mannosidase IA et II (Golgi) (K_i = 28 μM) et de l' α-mannosidase lysosomale (K_i = 17 μM). La swainsonine **145** a montrée une bonne inhibition, spécifique, vis-à-vis de l'α-mannosidase II (Golgi) et l'α-mannosidase lysosomale. La désoxymannojirimycine **5** n'inhibe pas l'α-mannosidase (RE) et est un inhibiteur plus moyen des autres enzymes. Cela montre une différence significative de la spécificité d'inhibition entre la manno-validamine **144** et les autres analogues. D'après les auteurs de cette étude, la manno-validamine et des dérivés *N*-alkylés pouvaient être de bons outils d'étude pour inhiber les α-mannosidases impliquées dans la biosynthèse des glycoprotéines. Mais nous n'avons pas trouvé de suite à ces travaux dans la littérature.

Ogawa et coll ont testés plusieurs dérivés 5a-carba-fucopyranosyle, inhibiteurs potentiels de l'α-fucosidase.^{62d,63} Ceux qui ont montré des propriétés inhibitrices intéressantes sont présentés dans le **Tableau 4**.

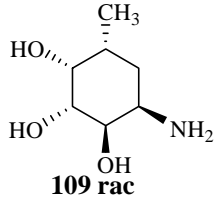
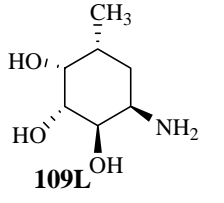
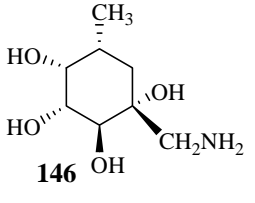
Inhibiteur	K _i en μM		
			
α-L-fucosidase (rein du bovin)	0,23	0,012	2,8

Tableau 4

^{62d} Ogawa, S. ; Sekura, R. ; Maruyama, A. ; Yuasa, H. ; Hashimoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2089-2093.

⁶³ Ogawa, S. ; Maruyama, A. ; Odagiri, T. ; Yuasa, H. ; Hashimoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 967-974.

Sans doute grâce à sa ressemblance avec le substrat naturel de l'enzyme (L-fucose), le dérivé **109L** est un bon inhibiteur de l' α -L-fucosidase. Il avait été d'abord testé sous sa forme racémique **rac-109**.

Le dérivé **146** est un inhibiteur moyen de cette enzyme, le changement de la position de la fonction amine n'est pas du tout favorable.

Des dérivés *N*-alkylés de **109L** ont aussi été testés. Les meilleurs résultats ont été obtenu avec le *N*-octyl de **109L** (0,016 μ M, α -L-fucosidase). De même des dérivés *N*-alkylés du **109** racémique ont été testés, Dans ce cas aussi, la bonne constante d'inhibition a été obtenue avec le dérivé *N*-octyl (0,009 μ M, α -L-fucosidase)^{62c,64}

III.3. Agents thérapeutiques pour des maladies génétiques lysosomales

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre I, il existe deux principales stratégies thérapeutiques impliquant des iminosucres et des aminocyclitols. On trouve soit des inhibiteurs de la biosynthèse des glycosphingolipides, notamment actifs sur la β -glucocérébrosidase, la β -galactocérébrosidase, la glucocéramide synthase et de l' α -fucosidase soit des inhibiteurs actifs sur les enzymes mutées agissant comme molécules chaperonnes.

Ogawa et coll ont testé la valiénamine et des analogues *N*-alkylés de céramides naturels **E-125** et **E-147** sur la β -glucocérébrosidase et la β -galactocérébrosidase.^{66,80}

Pour compléter cette étude, des dérivés di-*N*-alkylés et *N*-alkanoylé-*N*-alkylé de la valiénamine ont été par la suite synthétisés et testés.⁸¹

Aucune des molécules testées n'est inhibitrice de la glucocéramide synthase.

Un extrait des résultats les plus intéressants est présenté dans le **Tableau 5**.

Ces inhibiteurs sont sélectifs. La *N*-octyl- β -valiénamine **148** (IC₅₀ = 0,03 μ M, β -glucocérébrosidase) est nettement meilleure que le dérivé **E-125** (IC₅₀ = 0,3 μ M) qui contient une partie mimant un céramide. Ce résultat montre que le remplacement de la partie hydrophobe du glucocéramide par une chaîne alkylée simple améliore l'inhibition.

La valiénamine n'est pas inhibiteur, l'introduction de la chaîne aliphatique sur l'amine a donc permis une bonne reconnaissance de ces molécules par la β -glucocérébrosidase.

^{62c} Ogawa, S. ; Mori, M. ; Takeuchi, G. ; Doi, F. ; Watanbe, M. ; Sakata, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2811.

⁶⁴ Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Ito, N. ; Watanabe, M. ; Kabawam, K. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 995-1002.

⁶⁶ Tsunda, H. ; Inokuchi, J.-i. ; Yamagishi, K. ; Ogawa, S. *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 279.

⁸⁰ Ogawa, S.; Ashiura, M.; Chikara, U. ; Watanabe, S.; Yamazaki, C.; Yamagishi, K.; Inokuchi, J.-I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 929.

⁸¹ Ogawa, S. ; Kobayashi, Y. ; Kamayaba, K. ; Jimbo, M. ; Inokuchi, J.-i. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1955.

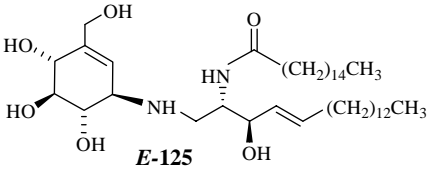
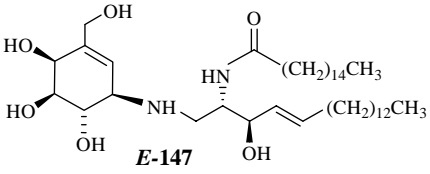
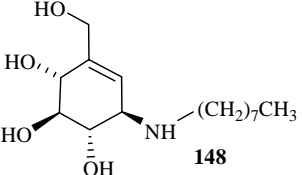
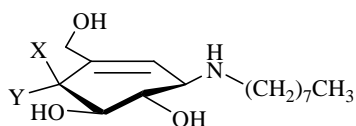
Inhibiteur	IC ₅₀ (μM)	
	β-glucocérébrosidase	β-galactocérébrosidase
 E-125	0,3	NI
 E-147	NI	2,7
 148	0,03	NI

Tableau 5

Les aminocyclitols actifs en tant que molécules chaperonnes ont déjà été présentés dans le chapitre I (paragraphe II.3.2).

Parmi les différents analogues *N*-alkylés de la valiénamine où la longueur de chaîne variait, la NOV (*N*-octyl-β-valiénamine) et la NOEV (*N*-octyl-β-épivaliénamine) se sont révélés les plus actives.



NOV : X = H, Y = OH

NOEV : X = OH, Y = H

NOEV est active sur la β-galactosidase mutée dans les maladies gangliosidose GM1 et Morquio B (IC₅₀ = 0,2 μM, β-galactosidase humaine). NOV est active sur la β-glucocérébrosidase mutée dans la maladie de Gaucher (IC₅₀ = 3 μM, β-glucocérébrosidase humaine).^{40,82}

⁴⁰ Lin, H. ; Sigumoto, Y. ; Ninomya, H. ; Oka, A. ; Taniguchi, M. ; Ida, H. ; Eto, Y. ; Ogawa, S. ; Matsuzaki, Y. ; Sawa, M. ; Inoue, T. ; Higaki, K. ; Nanba, E. ; Ohno, K. ; Suzuki, Y. *Biochem. Biophys. Acta.* **2004**, 1689, 219.

⁸² Matsuda, J. ; Suzuki, O. ; Oshima, A. ; Yamamoto, Y. ; Noguchi, A. ; Takimoto, K. ; Itoh, M. ; Matsuzaki, Y. ; Yasuda, Y. ; Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Nanba, E. ; Higaki, G. ; Ogawa, Y. ; Tominaga, L. ; Ohno, K. ; Iwasaki, H. ; Watanabe, H. ; Brady, R. O. ; Suzuki, Y. *PNAS*, **2003**, 100, 15912.

CHAPITRE III : LES ALDOLASES

I. Généralités sur les aldolases

Les aldolases sont des lyases qui catalysent la formation stéréosélective de liaisons C-C selon une réaction d'aldolisation. Elles peuvent être scindées en quatre groupes suivant la structure des substrats et des produits de réaction.

Celles appartenant au premier groupe utilisent le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) comme substrat donneur. On les appelle les DHAP-aldolases. La réaction de condensation avec un aldéhyde fournit un cétose-1-phosphate (**Schéma 26**).

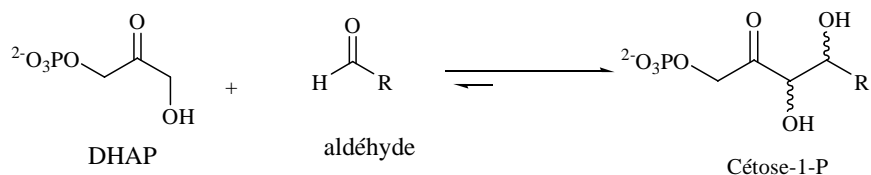


Schéma 26

Les DHAP aldolases sont les plus décrites dans la littérature en tant que catalyseur pour la formation stéréosélective de la liaison C-C et l'accès à des analogues de monosaccharides. Nous nous intéresserons principalement à ce groupe dans la suite de cette partie bibliographique.

D'autres utilisent le pyruvate ou le phosphoenol pyruvate (PEP) (dans ce cas se sont des ligases) comme nucléophiles et conduisent à des 3-désoxy-2-cétoacides⁸³ (**Schéma 27**).

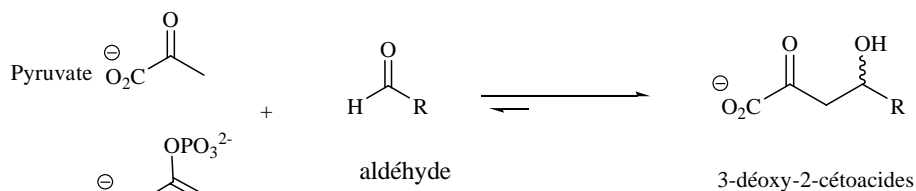


Schéma 27

Le troisième groupe d'aldolases est celui des désoxyribose-5-phosphate aldolases qui utilisent l'acétaldéhyde comme nucléophile et conduisent à des 2-désoxyaldoses⁸⁴ (**Schéma 28**).

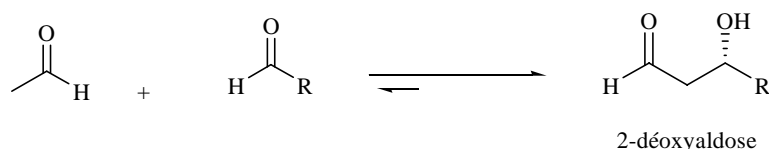


Schéma 28

Le dernier groupe est celui des thréonines aldolases. Dans ce cas, la glycine est le nucléophile⁸⁵. Elles sont utilisées en synthèse pour générer des aminoacides modifiés (**Schéma 29**).

⁸³ Wong, C.-H. ; Whitesides, G. M. *Enzymes in synthetic Organic Chemistry*, Pergamon Ed., **1994**, p 198-199.

⁸⁴ Barbas, C. F. III ; Wang, Y.-F. ; Wong, C. -H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2013.

⁸⁵ Machajewski, T. D. ; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **2000**, *39*, 1352.

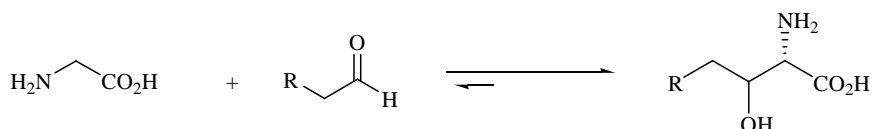


Schéma 29

II. Les DHAP aldolases

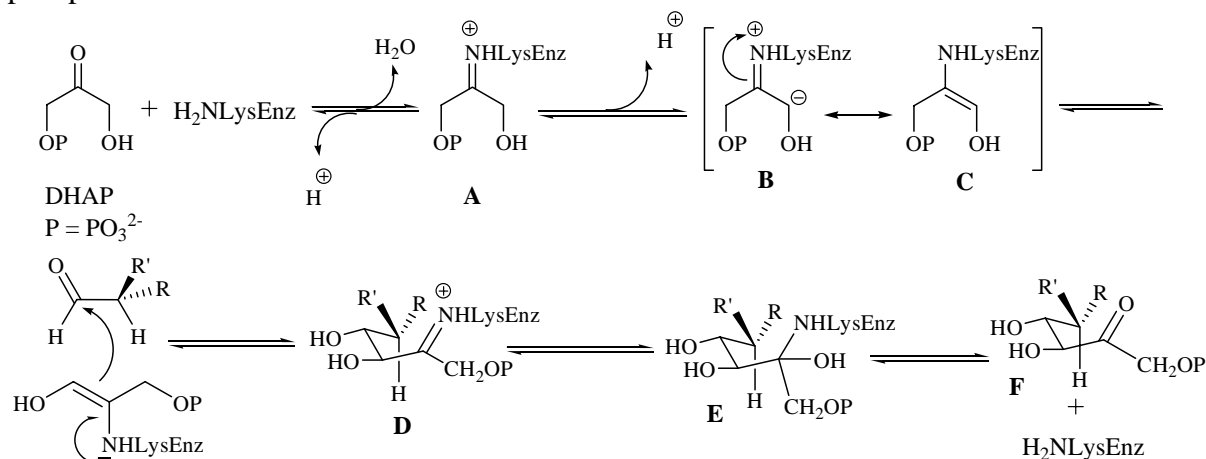
Les DHAP-aldolases sont présentes chez tous les organismes vivants où elles catalysent l'interconversion des hexoses et des sucres à trois carbones. Elles condensent le DHAP sur un aldéhyde, pour conduire à un cétose-1-phosphate.

Elles sont répertoriées en deux classes en fonction de leur mécanisme⁸⁶. A la classe I appartiennent les enzymes issues de l'animal, de plantes supérieures, d'algues vertes mais aussi de certaines bactéries comme *Peptococcus aerogenes*. Ces enzymes ne nécessitent pas l'intervention d'ions métalliques comme cofacteurs.

Les aldolases de la classe II sont présentes chez les bactéries, les levures et les champignons. Leur fonctionnement nécessite la présence d'ions divalents comme Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Fe^{2+} .

II.1. Propriétés catalytiques

Pour les enzymes de la classe I, l'étude du mécanisme de la réaction est illustré pour la fructose-1,6-diphosphate (**Schéma 30**). Il a été montré qu'il y a d'abord formation d'une base de Schiff par réaction entre la fonction amine d'un résidu lysine de l'enzyme et le carbonyl du DHAP puis départ du proton *proS* du DHAP pour former l'intermédiaire **B**. L'énamine **C** (forme mésomère de **B**) s'additionne sur la face *si* du carbone prochiral du substrat aldéhyde accepteur formant ainsi une autre base de Schiff **D**, précurseur du cétose phosphate **F**.



⁸⁶ Horecker, B. L. ; Tsolas, O. ; Lai, C. -Y. *The enzymes* ; Boyer, P. D. Ed.; Academic Press : New York, **1975**, Vol. III, p 213.

Chez les aldolases de classe II, les cations agissent en tant qu'acide de Lewis dans le site actif (**Schéma 31**). Dans ce cas, il s'agit de la forme émol du DHAP qui se condense sur l'aldéhyde accepteur.

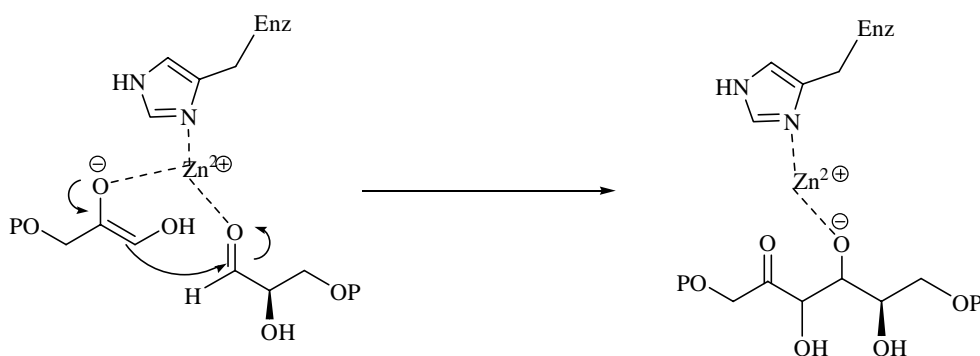


Schéma 31

II.2. Applications en synthèse

En suivant l'un ou l'autre de ces mécanismes, elles contrôlent de façon différente la stéréochimie des carbones 3 et 4 (**Figure 30**).

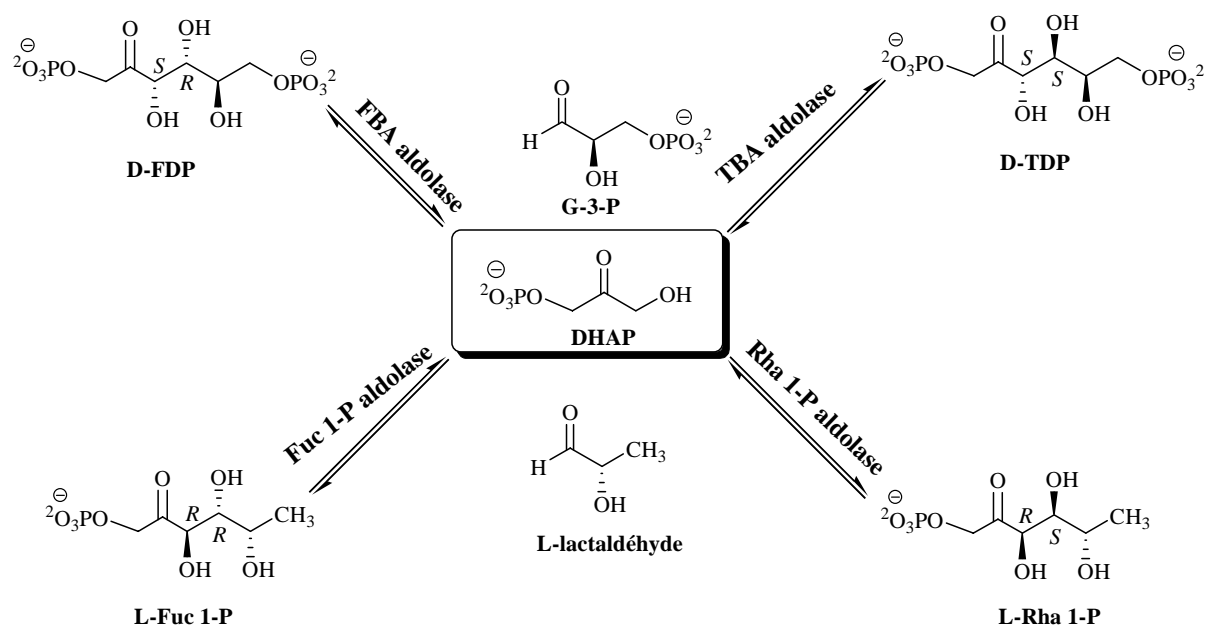


Figure 30

In vitro, la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA, classe I) catalyse la réaction de condensation entre le DHAP et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G-3-P) pour former le D-fructose-1,6-bisphosphate (D-FBP) avec la stéréochimie 3S/4R.

En utilisant les mêmes substrats, la fucose 1-phosphate aldolase (Fuc 1-P aldolase, classe II) et la rhamnose 1-phosphate aldolase (Rha 1-P aldolase, classe II) catalysent la condensation entre le DHAP et le L-lactaldéhyde pour donner respectivement le L-fucose-1-phosphate (3R/4R) et le L-rhamnose-1-phosphate (3R/4S)⁸⁷. La tagatose-1,6-

⁸⁷ Gijzen, H. J. M. ; Qiao, L. ; Fitz, W. ; Wong, C. -H. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 443.

bisphosphate aldolase (TBA, classe I) en principe devrait catalyser la réaction de condensation entre le DHAP et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G-3-P) pour former le D-tagatose-1,6-bisphosphate (D-TBP)⁸⁸. En réalité, elle n'est stéréospécifique que dans le sens de la rétroaldolisation. *In vitro*, dans le sens de la condensation, elle donne la même stéréochimie que le fructose-1,6-bisP.

Il est ainsi possible, en théorie, d'accéder à l'un des des trois stéréosomères en utilisant l'une ou l'autre de ces aldolases.

II.3. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase

II.3.1. Introduction

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase est l'enzyme la plus utilisée pour la formation stéréospécifique d'une nouvelle liaison carbone-carbone, en particulier pour la synthèse d'analogues de sucres. Elle permet un bon contrôle stéréospécifique de la réaction.

Dans la glycolyse, l'aldolase catalyse la rupture de la liaison C3-C4 du D-FBP en donnant deux trioses : le DHAP et le G-3-P (**Figure 31**).

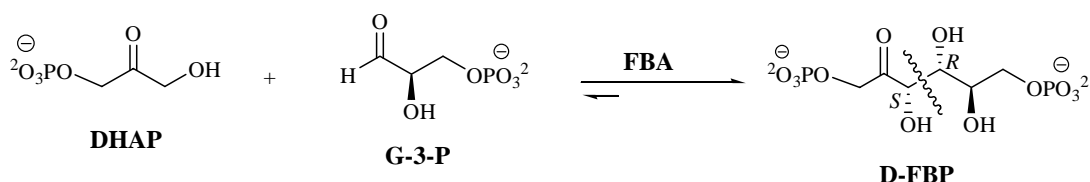


Figure 31

La variation d'énergie libre standard de coupure par le FBA aldolase est de +20,9 kJ.mol⁻¹, à laquelle correspond la constante d'équilibre K_{éq} :

$$[K_{eq}] = \frac{[\text{G3P}] \times [\text{DHAP}]}{[\text{D-FBP}]}$$

Etant donné la valeur positive de l'énergie libre standard, la réaction est très défavorable dans le sens de la scission. Cependant, les étapes glycolytiques ultérieures utilisent le G-3-P en continu et permettent de surmonter les conditions thermodynamiques défavorables. Le D-FBP est transformé progressivement en G-3-P.

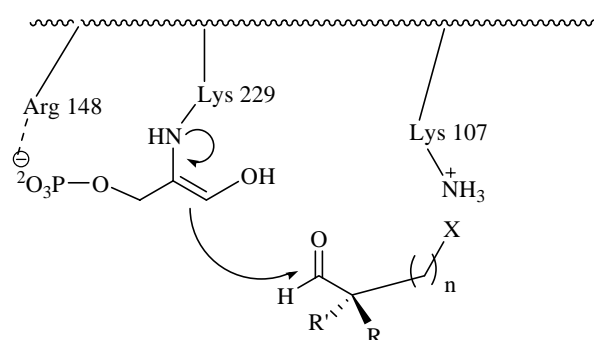
Comme *in vitro*, l'équilibre est déplacé en faveur de la condensation, cette enzyme est très utilisée en synthèse. Elle est commercialisée, extraite du muscle de lapin (E.C.4.1.2.13). Elle est aussi couramment appelée RAMA.

II.3.2. Le site actif

Dans le site actif de la FBA (**Figure 32**), l'activation du DHAP par formation d'une base de Schiff est assurée par la lysine 229. Le groupement guanidine de l'arginine 148 stabilise le DHAP en interagissant avec la charge négative du groupement phosphate. Un autre résidu

⁸⁸ (a) Crow, V. L. ; Thomas, T. D. *J. Bacteriol.* **1982**, 151, 600. (b) van, Rooijen, R. J. ; van Schalkwijk, S. ; De Vos, W. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 7176.

lysine du site actif (lysine 107) stabilise le groupement phosphate du G-3-P et joue un rôle important dans l'énantiosélectivité en C2 de l'aldéhyde accepteur⁸⁹.



Dans le cas de G-3-P, X = OPO_3^{2-} , R = OH, R' = H, n=1

Figure 32

Des études cristallographiques récentes⁹⁰ ont été réalisées sur des sites actifs de mutants de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (classe I) provenant d'un microorganisme de *Thermoproteus tenax*, enzyme de classe I, en présence de son substrat naturel, le fructose-1,6-bisphosphate. Elles ont montré la nécessité d'un donneur de proton pour convertir le carbinolamine du fructose-1,6-bisphosphate en base de Schiff **D** (Schéma 30 étape E-D). Il s'agit de la tyrosine 146.

Si cette aldolase est très spécifique du DHAP, elle tolère une grande variété d'aldéhydes comme substrats. En général, dans le cas d'un aldéhyde racémique, elle n'est pas énantiosélective mais sous contrôle cinétique il est possible de faire réagir préférentiellement l'un des deux énantiomères. Cela fait de cette enzyme un excellent outil pour accéder à de nombreux monosaccharides et analogues, naturels ou non.

III. Le DHAP

Comme nous venons de le voir, le DHAP est indispensable pour la synthèse par voie enzymatique des sucres connus ou analogues mettant en jeu des réactions d'aldolisation. De plus, l'utilisation régulière de la FBA en synthèse s'associe avec la nécessité de disposer d'une source abondante et stable de DHAP. Sa synthèse a donc suscité l'intérêt de nombreuses équipes.

Cette molécule, a priori simple, est en réalité difficile à préparer, c'est un produit instable qui s'hydrolyse en milieu aqueux. Ceci peut expliquer le coût élevé du DHAP commercial.

Trois stratégies de synthèse du DHAP ont été développées : chimique, enzymatique et chimioenzymatique. Une fois encore, notre but n'est pas de rapporter toute la bibliographie parue à ce sujet. Nous avons choisi de présenter les synthèses les plus récentes.

⁸⁹ (a) Lai, C. Y. ; Nakai, N. ; Chang, D. *Science* **1974**, *183*, 1204. (b) Lubini, D. G. E. ; Christen, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 2527. (c) Sygush, J. ; Beaudy, D. ; Allaire, M. ; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 7846. (d) Lees, W. J. ; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1887.

⁹⁰ Lorentzen, E. ; Siebers, B. ; Hensel, R. ; Pohl, E. *Biochemistry*. **2005**, *44*, 4222.

Les différents précurseurs qui ont déjà été utilisés sont répertoriés dans la **Figure 33**. En général, ils comportent les 3 atomes de carbones nécessaires et sont polyfonctionnelles.

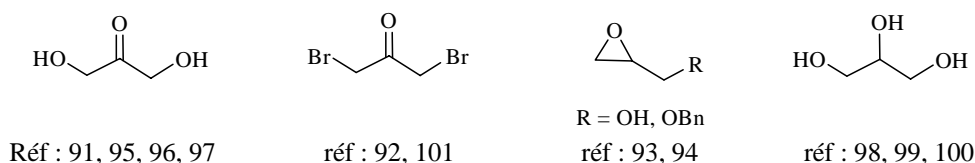


Figure 33

Les stratégies de préparation du DHAP sont alors basées sur des modifications de groupements fonctionnels et/ou des étapes de protection-déprotection.

III.1. Synthèses chimiques

III.1.1. A partir de la dihydroxyacétone

Wong et coll⁹¹ ont utilisé la dihydroxyacétone sous forme dimère (DHA) comme réactif de départ (**Schéma 32**). Les groupements hydroxyles du DHA protégé **149** sont phosphorylés au moyen du chlorure de diphénylphosphate (DPPC). L'hydrogénolyse des groupements phényles sur oxyde de platine suivie par l'hydrolyse du groupe acétal mène au DHAP avec un rendement de 61% sur quatre étapes.

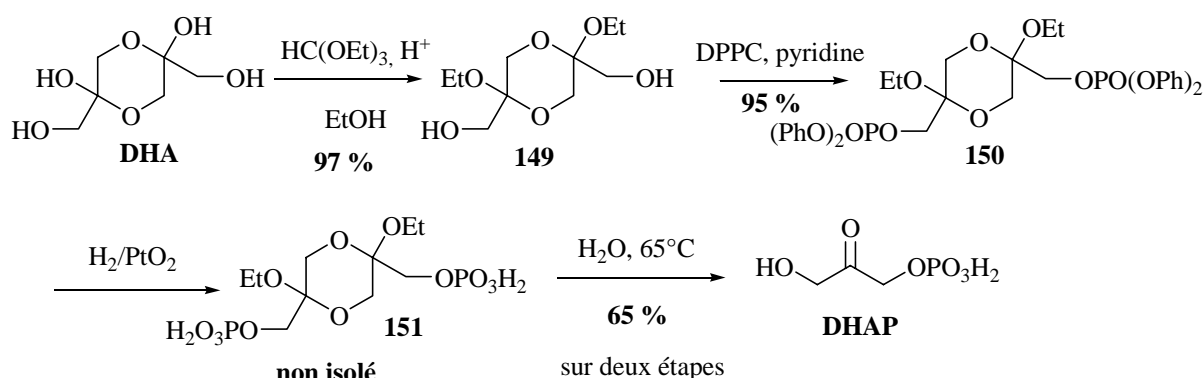


Schéma 32

C'est la synthèse la plus employée dans la littérature car elle comporte peu d'étapes et pas de purifications sur gel de silice. Néanmoins, la première étape se déroule sur plusieurs jours et pour l'hydrogénation, le catalyseur utilisé (PtO₂) est très coûteux. De plus, le DHAP obtenu n'est pas très pur.

III.1.2. A partir de la 1,3-dibromoacétone

Le DHAP a été synthétisé à partir de la 1,3-dibromoacétone en cinq étapes (**Schéma 33**)⁹². Le traitement de **152** permet la protection de la fonction cétone et également la

⁹¹ Jung S.-H. ; Jeong, J.-H. ; Miller P. ; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7182.

⁹² Gefflaut, T. ; Lemaire, M. ; Valentin, M.-L. ; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5920.

substitution d'un atome de brome par un groupement hydroxyle. Ensuite le dérivé **153** est phosphorylé en utilisant l'iodure de dibenzylphosphate (DBPI) généré in situ par oxydation du tribenzylphosphite par l'iode. L'hydrogénolyse des groupements benzyles suivie par l'hydrolyse de l'acétal et la débromation mènent au DHAP avec un rendement de 56%.

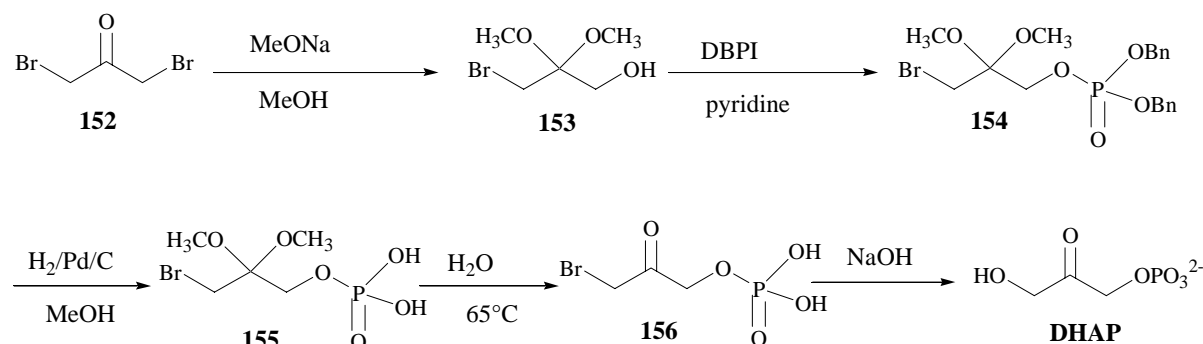


Schéma 33

Dans ce cas, c'est l'étape de substitution nucléophile finale du brome (de **156** au DHAP) qui est délicate à contrôler. Les variations de pH brutales conduisent à l'hydrolyse prématurée du DHAP.

III.1.3. A partir du glycidol

Récemment, Meyer *et al*^{93,94} ont proposé deux synthèses courtes du DHAP, en utilisant le glycidol ou le glycidol protégé comme réactif de départ (Schéma 34).

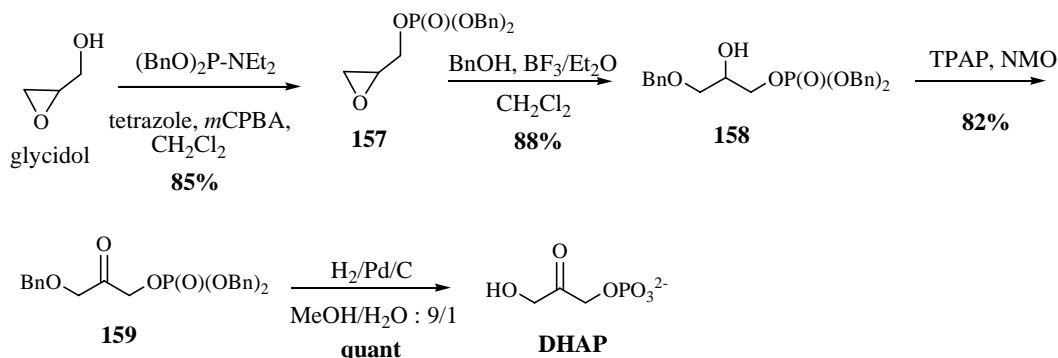


Schéma 34

L'étape clef de la première synthèse est l'ouverture régiosélective de l'époxyde **157**. L'hydrogénation sur palladium de **159** mène quantitativement au DHAP. Cette synthèse a l'avantage d'être courte et donne le DHAP avec une bonne pureté, mais elle nécessite l'utilisation d'un agent d'oxydation doux relativement coûteux, pour oxyder sélectivement l'hydroxyle du dérivé **158**.

Cherchant à améliorer la synthèse de **158**, ces auteurs sont partis du glycidol protégé (Schéma 35). L'ouverture de l'époxyde est réalisée directement par un phosphate en

⁹³ Meyer, O. ; Rohmer, M. ; Grosdemange-Biallard, C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7921.

⁹⁴ Meyer, O. ; Ponaire, S. ; Rohmer, M. ; Grosdemange-Biallard, C. *Org. Lett.* **2006**, 19, 4347.

présence d'un acide de Lewis. Cette deuxième méthode est la synthèse la plus courte existant dans la littérature.

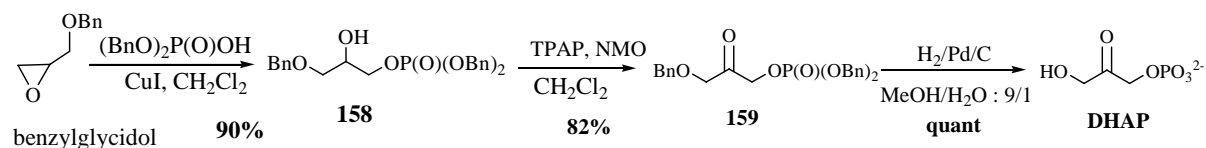


Schéma 35

III.2. Synthèses enzymatiques

La préparation du DHAP par voie enzymatique constitue une alternative aux synthèses organiques multi-étapes. En effet, les synthèses enzymatiques permettent de préparer le DHAP en un seul pot et d'être couplées avec la condensation aldolique. Selon le réactif de départ, trois grandes stratégies de synthèse sont apparues.

III.2.1. Phosphorylation directe de la dihydroxyacétone

Le DHAP peut être directement obtenu par phosphorylation enzymatique de la dihydroxyacétone (DHA), l'enzyme utilisée étant la glycérol kinase⁹⁵ (Schéma 36).

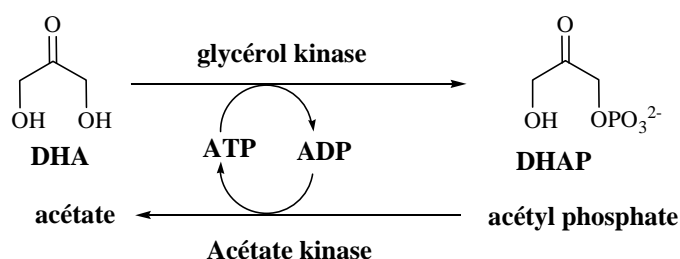


Schéma 36

L'agent de phosphorylation est l'adénosine triphosphate (ATP) qui est transformé en adénosine bisphosphate (ADP). Il est utilisé en quantité catalytique et doit être donc régénéré au cours de la synthèse. Cette régénération consiste en une phosphorylation enzymatique de l'ADP en ATP par l'acétate kinase, avec l'acétylphosphate comme substrat. Le DHAP est obtenu en solution aqueuse relativement dilué (0,1 à 0,2 M), avec un rendement acceptable et une assez bonne pureté.

Itoh *et al.*⁹⁶ ont proposé une amélioration de cette synthèse en remplaçant la glycérol kinase par la dihydroxyacétone kinase isoenzyme I, isolée après l'expression de son gène dans *E. coli*.

Ces méthodes déplacent simplement le problème de la synthèse chimique. En effet, on doit utiliser un agent de phosphorylation, lui-même instable et relativement difficile à préparer.

⁹⁵ Wong, C. H. ; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3199.

⁹⁶ Itoh, N. ; Tujibata, Y. ; Liu, J. Q. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 51, 193.

Récemment, Herk *et al.* ont publié une nouvelle méthode enzymatique de génération du DHAP à partir du DHA⁹⁷. Une seule enzyme a été utilisée, la phosphatase acide de *Shigella flexneri* et le pyrophosphate comme donneur de phosphate. Après optimisation des différents facteurs, le DHAP est obtenu avec un rendement de 20%.

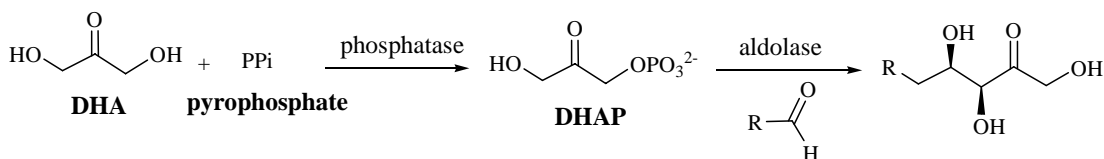


Schéma 37

Cette méthode utilise comme donneur de phosphate un phosphate inorganique, mais le DHAP est obtenu avec un faible rendement car l'enzyme catalyse aussi la déphosphorylation du DHAP. Elle offre la possibilité d'hydrolyser le phosphate du produit de la condensation formé *in situ* par couplage entre le DHAP et le propionaldéhyde. Malheureusement cette enzyme n'est pas commerciale et donc inaccessible.

III.2.2. Phosphorylation du glycérol puis oxydation

Cette méthode consiste à phosphoryler le glycérol par le pyrophosphate en présence de la phytase, avant oxydation par la glycérolphosphate oxydase (GPO)⁹⁸. L'étape de régénération du cofacteur ne nécessite pas l'action d'une deuxième enzyme. En effet, le cofacteur est dans ce cas le FAD qui une fois réduit en FAD(H)₂ reste lié à l'enzyme et est rapidement réoxydé par l'oxygène de l'air avec libération de H₂O₂. La catalase évite l'accumulation toxique de l'eau oxygénée.

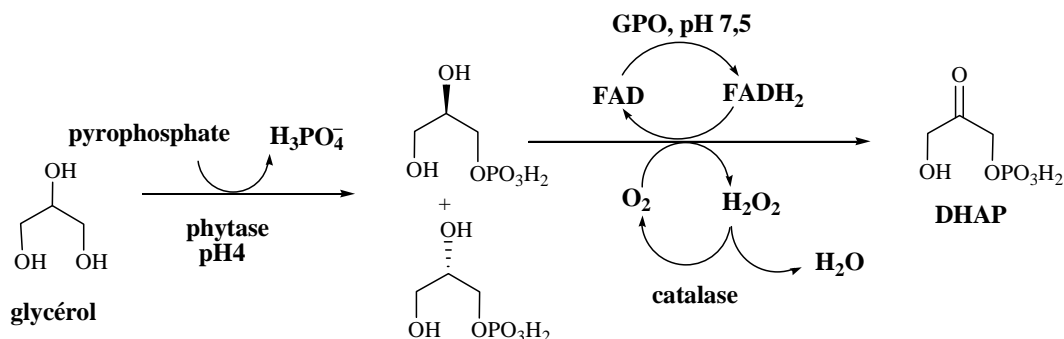


Schéma 38

Le bon fonctionnement de la GPO nécessite une dilution avec le glycérol. Cependant, elle ne réagit qu'avec l'énantiomère L du glycérol-1-phosphate provenant du L-glyceraldéhyde et elle est inhibée par le DHAP. Par conséquent le DHAP n'est obtenu qu'à faible concentration et dans une solution contenant beaucoup de glycérol.

La glycérol kinase peut être utilisée pour phosphoryler le glycérol⁹⁹ (**Schéma 39**). Lié à l'emploi de cette enzyme, l'agent de phosphorylation est l'ATP, qui doit être régénéré.

⁹⁷ Herk, v. T. ; Hartog, A. F. ; Schoemaker, H. E. ; Wever, R. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6244.

⁹⁸ Schoevaart, R. ; van Rantwijk, F. ; Sheldon, R. A. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6940.

⁹⁹ Hettwer, J. ; Oldenburg, H. ; Flaschel, E. *J. Mol. Catal. B.* **2000**, 19, 215.

L'enzyme ne donne que le L-glycérol phosphate. L'oxydation est identique à celle de la méthode précédente.

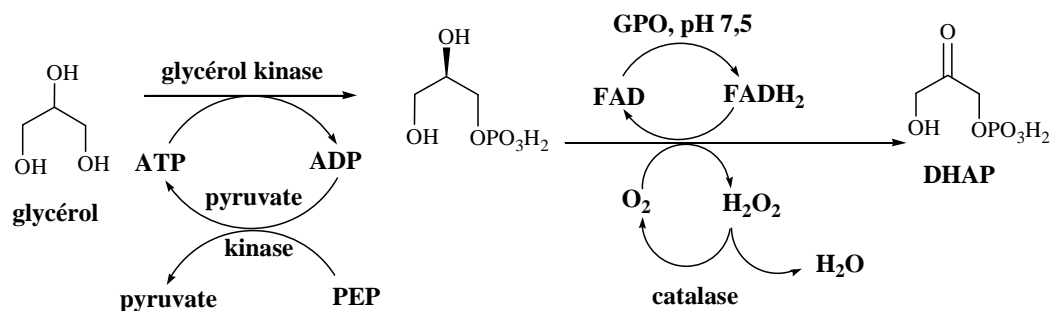


Schéma 39

Après optimisation des conditions de la réaction, le DHAP est obtenu avec un rendement de 60%.

Une amélioration de cette voie de synthèse a été apportée par Streitenberger et al¹⁰⁰. Afin de faciliter l'élimination des enzymes, la GPO est apportée par un microorganisme (*Aerococcus viridans*) et co-immobilisée avec la catalase.

III.3. Synthèses chimioenzymatiques

Le principe de ces synthèses consiste à utiliser des enzymes pour réaliser des étapes clés, comme des réactions régiosélectives.

III.3.1. A partir de la dibromoacétone

M.-L. Valentin et J. Bolte¹⁰¹ ont utilisé la dibromoacétone comme produit de départ (Schéma 40).

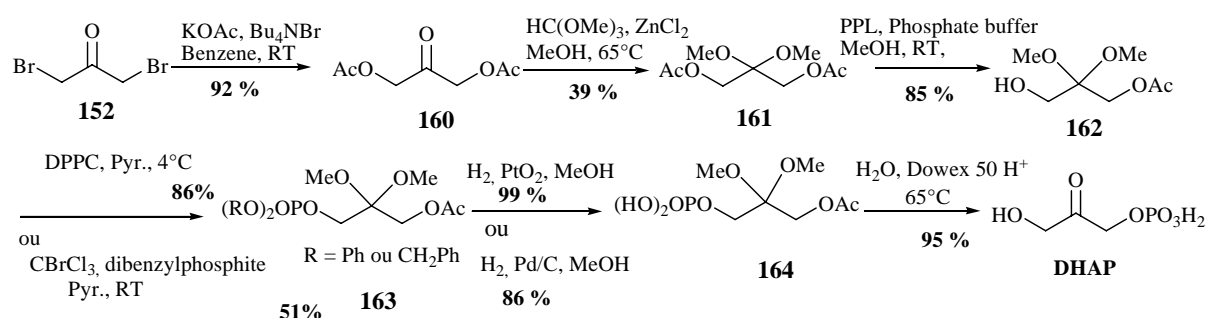


Schéma 40

Après substitution nucléophile, la fonction cétone de **160** est protégée sous forme de diméthoxyacétal. La monohydrolyse des fonctions esters de **161** est réalisée grâce à une

¹⁰⁰ Streitenberger, S. A. ; Villaverde, M. J. ; Sánchez-Ferrer, Á. ; Garcia-Carmona, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 58, 73.

¹⁰¹ Valentin M.-L. ; Bolte J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 1167.

lipase. Deux dérivés phosphorylés sont alors préparés (diphényle et dibenzyle) et après hydrogénéolyse et hydrolyse, le DHAP est formé.

Si les rendements de cette méthode sont corrects, les étapes sont nombreuses, parfois longues. On ne peut pas non plus s'affranchir des purifications par chromatographie sur gel de silice. De plus, la dernière étape est difficile à contrôler, à 65°C le DHAP est très rapidement hydrolysé.

III.3.2. A partir du glycidol

Récemment, Chamantray *et al.*¹⁰² ont généré le glycérolphosphate à partir du glycidol, phosphorylé chimiquement par un donneur de phosphate inorganique. Puis par action de la GPO selon le procédé décrit précédemment, le DHAP est formé.

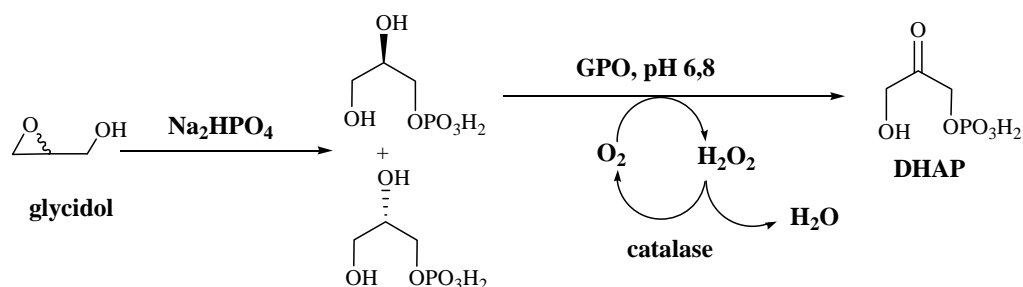


Schéma 41

Après optimisation des différentes conditions, le glycérol-3-phosphate a été obtenu avec un rendement moyen. Dans ce cas aussi, la solution finale de DHAP contient du phosphate inorganique et du D-glycérol-3-phosphate.

IV. Utilisation de la FBA en synthèse organique

Comme nous l'avons vu, cette enzyme est très spécifique vis-à-vis du substrat donneur naturel, le DHAP, mais elle accepte une grande variété d'aldéhydes comme substrats accepteurs. La FBA est facilement accessible en quantité importante car elle est très abondante dans le muscle de lapin. De plus, cette enzyme est commercialisée à un prix raisonnable. Grâce à toutes ces caractéristiques, la FBA s'est imposée comme une enzyme stratégique pour l'obtention des composés difficilement accessibles par voie chimique.

De très nombreux exemples utilisant la FBA en synthèse organique ont été décrits : production de sucres marqués¹⁰³, d'iminosucres¹⁰⁴, de déoxythiosucres¹⁰⁵, des analogues de nucléosides¹⁰⁶ et de composés naturels¹⁰⁷.

¹⁰² Charmantray, F. ; Dellis, P. ; Samerth, S. ; Hecquet, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3261.

¹⁰³ Wong, C.-H. ; Shen, G.-L. ; Pederson, R. L. ; Wang, Y.-F. ; Hennen, W. J. *Metho. Enzymol.* **1991**, 202, 591.

¹⁰⁴ (a) Varas, F. M. ; Qian, X. H. ; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7647. (b) Takawama, S. ; Martin, R. ; Wu, J. ; Laslo, K. ; Suizdak, G. ; Wong, C. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8146. (c) Remero, A. ; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8264.

¹⁰⁵ Chou, W. C. ; Chen, L. ; Fang, J. M. ; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6191.

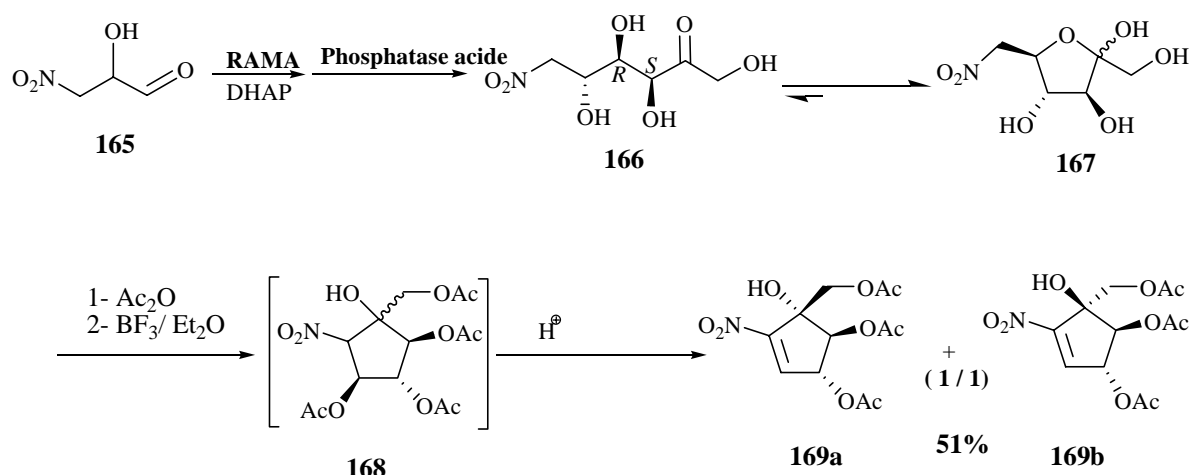
¹⁰⁶ Liu, K. K. C. ; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4789.

¹⁰⁷ Chênevert, R. ; Dasser, M. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4529.

Un bilan de ces synthèses a été illustré par D. Crestia¹⁰⁸. Nous allons donc, présenter les synthèses les plus récentes et ainsi que les applications de la FBA pour la synthèse de nitrocyclitols et d'minosucres.

IV.1. Synthèse de nitrocyclitols

Avant le démarrage de nos travaux, un seul exemple d'utilisation de la FBA pour préparer des nitrocyclitols avait été publié. Wong et al.¹⁰⁹ ont décrit la réaction de condensation catalysée par la FBA entre un aldéhyde nitré et le DHAP (**Schéma 42**).



Le dérivé 6-desoxy-6-nitro-D-fructofuranose **166** a été obtenu de façon stéréosélective en profitant de l'énantiosélectivité de la FBA qui permet dans ce cas un dédoublement cinétique. La nitroaldolisation intramoléculaire en présence de $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ (réaction de Henry)¹¹⁰ a été suivie d'une deshydratation en milieu acide. La cyclisation n'est pas stéréosélective, les auteurs ont isolé un mélange de diastéréoisomères **169a** et **169b**.

IV.2. Synthèse d'minosucres^{104b}

Les aldéhydes **170** et **174** réagissent avec le DHAP en présence de la FBA. Après hydrolyse du phosphate par action de la phosphatase, on obtient les azotures cycliques **171** et **175**. Un dédoublement enzymatique de l'azoture **171** a été réalisé grâce à une lipase. Pour l'étape de réduction, selon le catalyseur, les auteurs accèdent à une imine ou à une amine. En présence de palladium, l'hydrogénation permet de réduire l'azoture en amine qui forme ensuite intramoléculairement une imine après traitement en milieu basique. En présence de rhodium sous 15 psi, l'imine est réduite en amine.

¹⁰⁸ Crestia, D. ; Thèse de l'université Blaise Pascal, n° 321, **2001**.

¹⁰⁹ Chou, W.-C. ; Fostch, C. ; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2916.

¹¹⁰ (a) Rosini G. ; Ballini, R. *Synthesis* **1988**, 833. (b) Tamura R. ; Kamimura, A. ; Ono, N. *Synthesis* **1990**, 423.

^{104b} Takawama, S. ; Martin, R. ; Wu, J. ; Laslo, K. ; Suizdak, G. ; Wong, C. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8146.

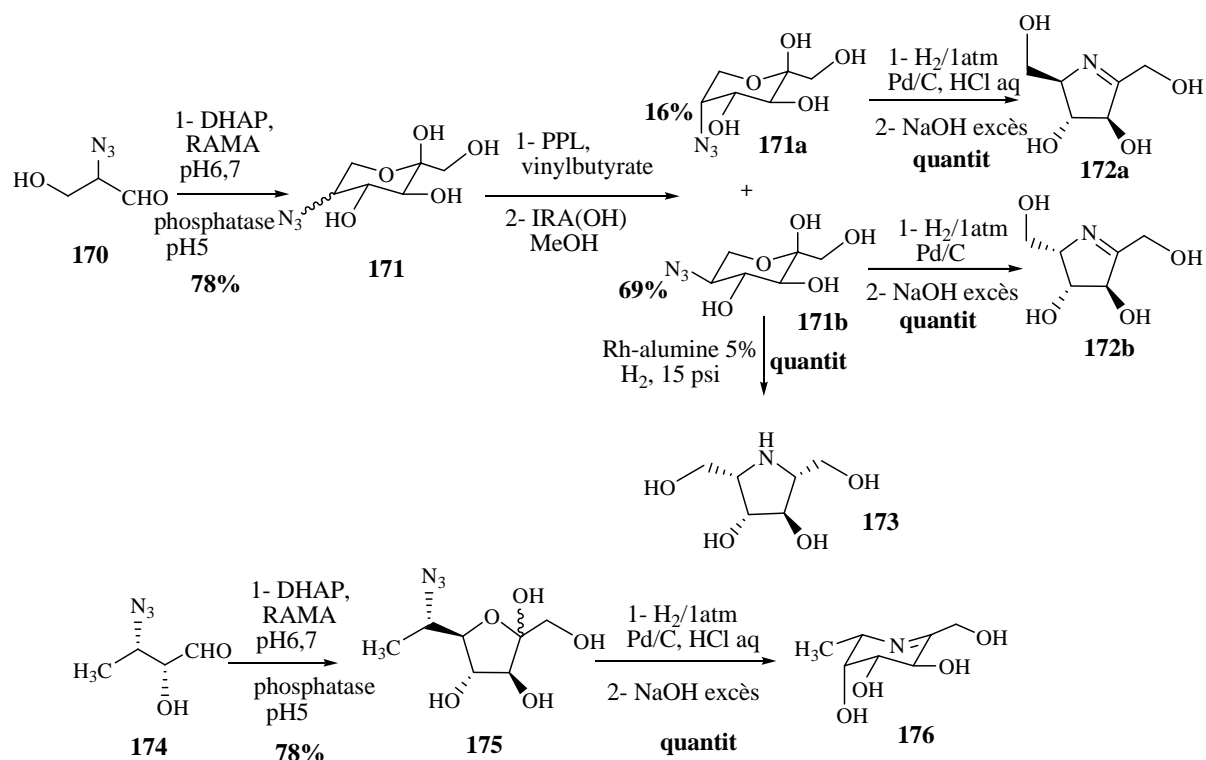


Schéma 43

Ces iminosucres sont des inhibiteurs de glycosidases, notamment de l' α -glucosidase et de l' α -fucosidase.

La FBA a été utilisée aussi pour préparer des (guanosine diphosphate) GDP-iminosucres, inhibiteurs potentiels de l' α -1,3-fucosyltransférase (**Schéma 44**)¹¹¹.

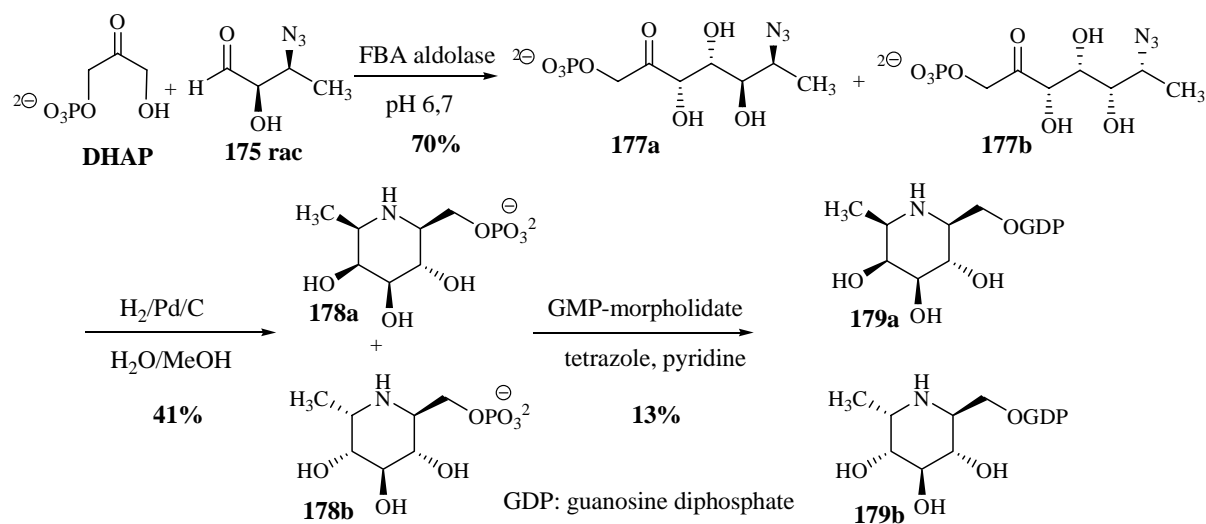
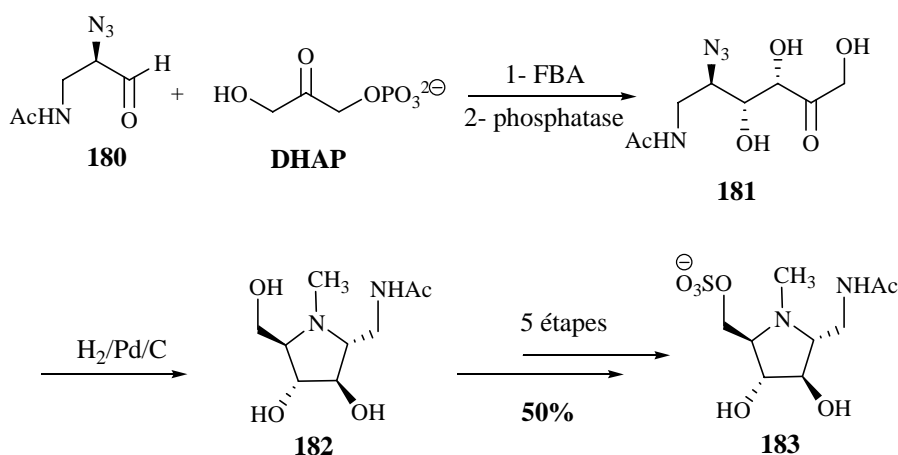


Schéma 44

¹¹¹ Mitchell, M. L. ; Lee, L. V. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5691.

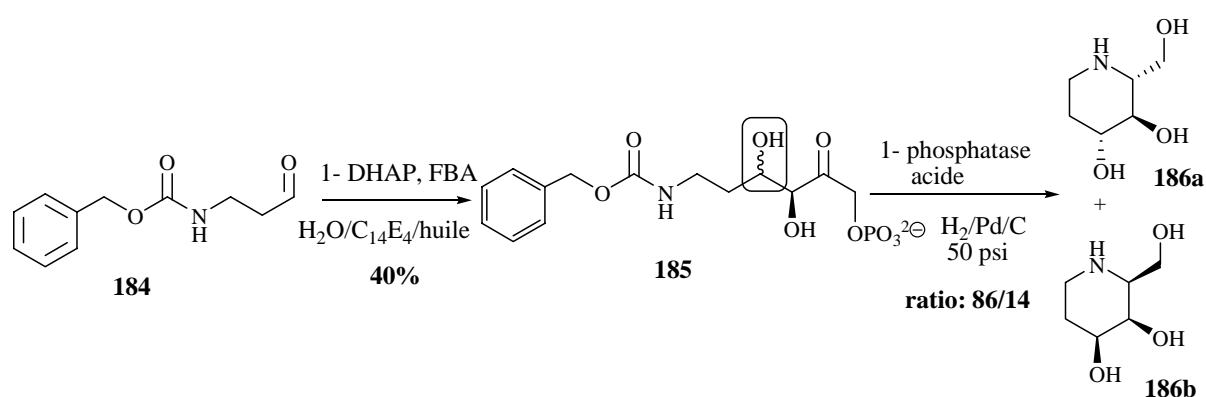
Le couplage entre l'azidoxybutyraldéhyde **175 rac** et le DHAP, catalysé par la FBA, a donné les phosphates non séparables **177a** et **177b**. L'hydrogénation catalytique du mélange **177a** et **177b** a permis la formation des iminosucres phosphates non séparables **178a** et **178b** dans les proportions (2 : 1) respectivement. La GDP a été introduite par coupure réductrice du phosphate. Après purification les GDP-iminosucres **179a** et **179b** ont été obtenu avec un rendement modeste dans les proportions (2 : 1).

Wong et coll ont utilisé la FBA pour synthétiser des iminosucres, inhibiteurs potentiels des hexosaminidases (**Schéma 45**).¹¹²



L'aldéhyde **180** réagit avec le DHAP en présence de la FBA. Le phosphate est hydrolysé par action de la phosphatase pour donner l'intermédiaire **181**. L'azoture est réduite ainsi l'iminosucre **181** a été formé. Il est ensuite transformé en **183** en cinq étapes.

Dans un système biphasique en émulsion, Clapés et coll ont préparé plusieurs iminosucres en couplant le DHAP avec des aminoaldéhydes¹¹³. Un exemple de ces synthèses est illustré dans le **Schéma 46**. L'iminosucre est formé par une amination réductrice.



¹¹² Liu, J. ; Shikhman, A. R. ; Lotz, M. K. ; Wong, C.-H. *Chem. Biol.* **2001**, 8, 701.

¹¹³ Espelt, L. ; Parella, T. ; Bujons, J. ; Solans, C. ; Joglar, J. ; Delgado, A. ; Clapés, P. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4887.

Ce rapport de 86/14 est dû à une moins bonne diastéréosélectivité de l'aldolase. En effet, elle a formé **185** 3*S*,4*R* majoritairement mais aussi **185** 4*R*,3*S*.

IV.3. Synthèse d'analogues du KDO

L'aldolase a aussi été utilisée pour préparer des précurseurs du KDO (acide 3-désoxy-D-*manno*-octulosonique). Il s'agit des travaux de thèse de D. Crestia.¹¹⁴

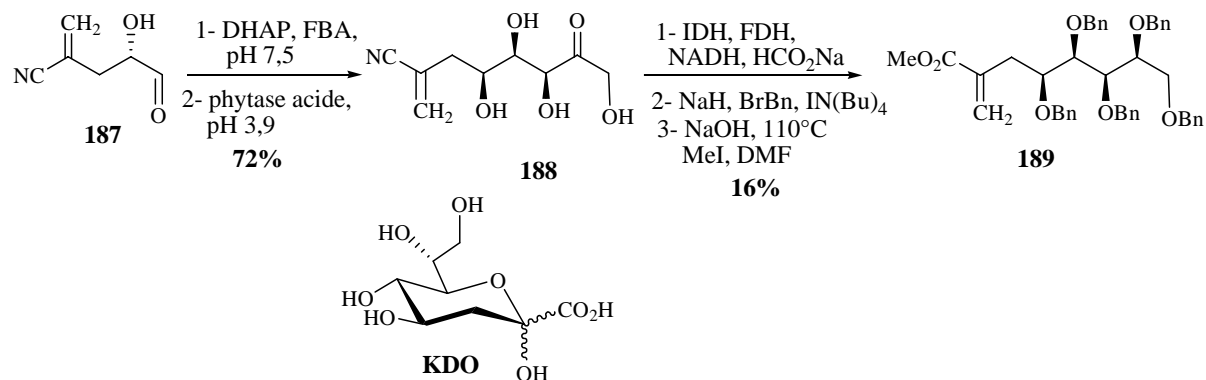


Schéma 47

La cétone **188**, préparée par couplage entre le DHAP et l'aldéhyde **187**, a été réduite sélectivement par un mélange de deux oxydoréductases. La IDH (L-iditol déshydrogénase) est utilisée pour réduire le carbonyle et la FDH (formate déshydrogénase) pour régénérer le NADH à partir du formate de sodium.

¹¹⁴ Crestia, D. ; Demuyck, C. ; Bolte, J. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 2417.

NOTRE STRATEGIE

Notre objectif est de synthétiser par voie chimioenzymatique de nouveaux aminocyclitols proches de la valioline. Par alkylation de la fonction amine primaire de ces aminocyclitols, on peut accéder à d'autres structures, analogues du salicinol et du voglibose. Toutes ces nouvelles molécules sont des inhibiteurs potentiels de glycosidases. Le **Schéma 48** illustre l'ensemble de notre stratégie.



Les aminocyclitols alkylés (analogues du voglibose) seront synthétisés par hydrolyse du groupement sulfate. Une substitution nucléophile de l'amine sur un sulfate cyclique fournira les structures zwitterioniques correspondantes (analogues du salacinol). L'alkylation de la fonction amine permettra d'étudier l'effet d'une chaîne polyhydroxylée sulfatée ou non sur l'inhibition ainsi que l'influence d'une charge positive permanente apportée par le zwitterion.

Cette méthodologie s'appuie sur des résultats antécédents où la formation d'un nitrocyclitol avait été observée à partir d'un dérivé nitré selon la réaction suivante¹⁰⁸:

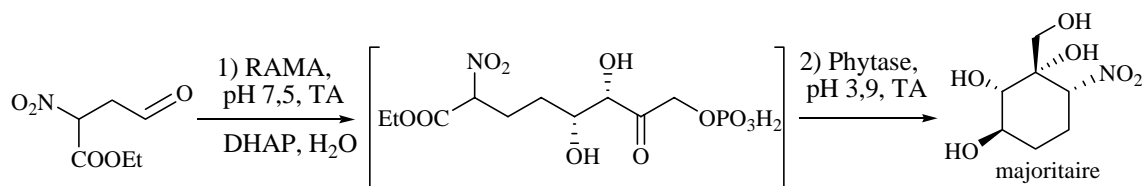


Schéma 49

Pendant cet enchaînement réactionnel, deux liaisons C-C sont formées de façon stéréosélective et le groupement éthoxycarboxyle est éliminé.

Nous allons ainsi étudier le couplage de différents nitrobutyraldéhydes avec le DHAP. La stéréosélectivité de la réaction de Henry sera déterminée en nous basant sur la stéréosélectivité de l'aldolase. D'autre part, nous devons aussi envisager la synthèse des aldéhydes nitrés ainsi que celle du DHAP.

II. Stratégie de synthèse des aldéhydes

Dans le schéma ci-dessous, les voies de synthèse envisagées pour les quatre aldéhydes sont décrites. Mis à part la synthèse du nitrobutyraldéhyde qui met en jeu une addition de Michael, l'étape commune repose sur la condensation entre le nitrométhane et un aldéhyde (réaction de Henry¹¹⁰).

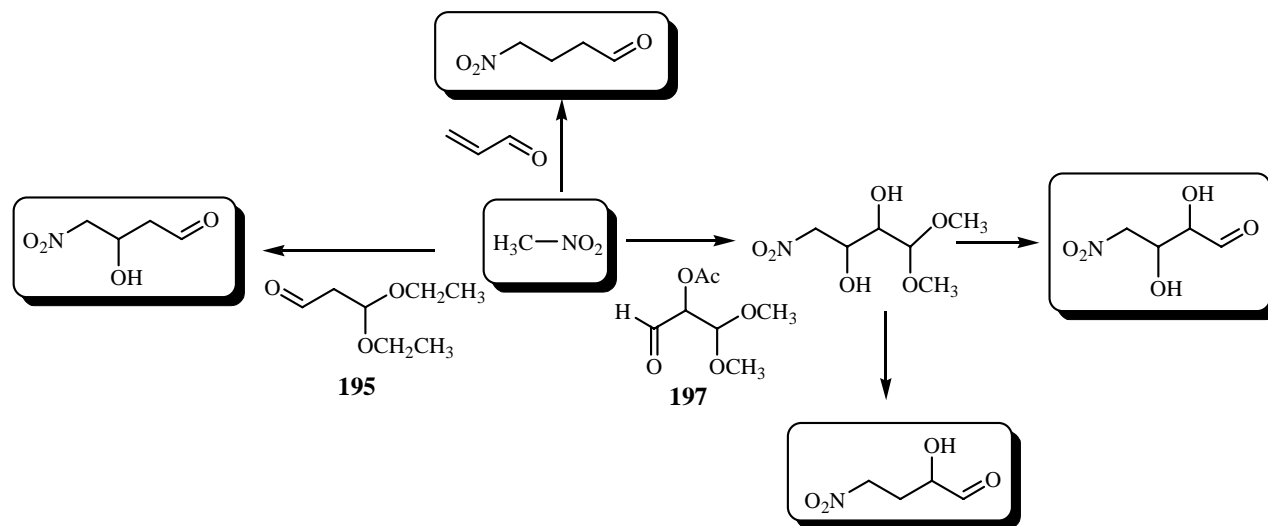


Schéma 50

Le nitrométhane nous permettra ainsi d'introduire le groupement $-\text{CH}_2\text{NO}_2$ sur des précurseurs constitués de trois carbones (l'acroléine et les aldéhydes **195** et **197**). Ainsi une réaction de Michael sur l'acroléine donnera le nitrobutyraldéhyde le plus simple.

¹⁰⁸ Crestia, D. ; Thèse de l'université Blaise Pascal, n° 321, **2001**.

¹¹⁰ (a) Rosini G. ; Ballini, R. *Synthesis* **1988**, 833. (b) Tamura R. ; Kamimura A. ; Ono, N. *Synthesis* **1990**, 423.

En ce qui concerne les trois autres substrats de l'aldolase, après la réaction de Henry, les fonctions aldéhydes seront toutes formées par hydrolyse acide des acétals. Les précurseurs **195** et **197** qui permettent d'introduire le motif $\text{NO}_2\text{-CH}_2\text{-CH-OH}$, seront générés par ozonolyse. **195** donnera accès à un intermédiaire commun pouvant conduire soit à un aldéhyde dihydroxylé par déprotection directe de l'acétal, soit à un aldéhyde monohydroxylé en α du carbonyle après une réaction d'élimination et réduction de la double liaison de la nitrooléfine correspondante.

Dans la mesure du possible, les alcools chiraux seront dédoublés à l'aide de lipases dans une réaction de transestérification pour réaliser des condensations aldoliques avec des aldéhydes optiquement enrichis.

III. Stratégie de synthèse du DHAP

Malgré les nombreuses méthodes décrites dans la littérature, aucune pour l'instant n'est pleinement satisfaisante, que ce soit au niveau de la pureté du DHAP obtenu ou de la durée de la synthèse, de la facilité de mise en oeuvre et des rendements. C'est pourquoi nous avons proposé une nouvelle synthèse chimique de cette molécule.

Dans le schéma ci-dessous, nous décrivons une nouvelle méthode inspirée des deux schémas **33** et **40** présentés en partie bibliographique. D'après les résultats de la littérature, nous savons que les étapes finales de la synthèse développée par M.-L. Valentin sont performantes (Schéma 40)¹⁰¹. Nous avons donc cherché à préparer le synthon **163** selon la méthode la plus courte possible.

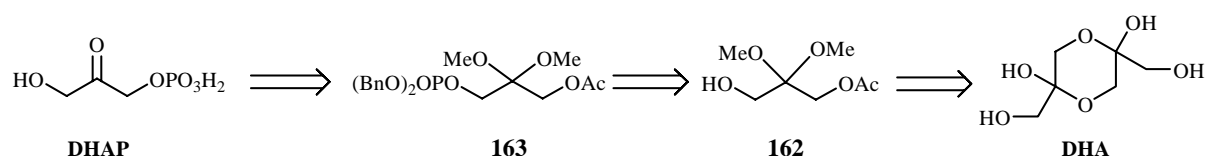


Schéma 51

A partir de **163**, le DHAP sera obtenu après des étapes de déprotection des trois groupements fonctionnels réalisées à la suite ou combinées : hydrogénation catalytique pour le phosphate, hydrolyse acide pour la cétone et hydrolyse acide ou basique pour l'alcool. Ce précurseur proviendra de la phosphorylation de **162**. Celui-ci sera préparé à partir de la DHA, après protection et monoestérification enzymatique.

Cette synthèse est courte et met en jeu des réactifs et catalyseurs peu coûteux. Nous espérons pouvoir la développer en travaillant sur de grandes quantités.

Dans la partie résultats et discussion, nous présenterons dans un premier temps la synthèse du DHAP, puis celle des aldéhydes. Dans un deuxième temps, la préparation des différents aminocyclitols et les résultats concernant le couplage entre un sulfate cyclique et ces aminocyclitols seront présentés. Enfin, nous commenterons les propriétés inhibitrices des différentes molécules synthétisées vis-à-vis de quelques glycosidases commerciales.

¹⁰¹ Valentin M.-L. ; Bolte, J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 1167.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Synthèse du DHAP

Nous avons développé une synthèse chimioenzymatique du DHAP en respectant les objectifs suivants :

- peu d'étapes et éviter si possible les purifications,
- disposer d'une grande quantité d'un produit de stockage stable,
- réactifs peu coûteux.

Parmi les différents précurseurs accessibles, nous avons choisi la DHA qui correctement protégée conduit à un diol qui sera monoestérifié grâce à une lipase. Dans ce cas, l'utilisation d'une lipase permet de profiter de la spécificité de substrat vis-à-vis de l'enzyme : le diol est meilleur substrat que son dérivé monoestérifié. Ce qui représente un réel avantage par rapport à une voie de monoestérification chimique souvent difficile à contrôler. L'ester phosphorique est benzylique car c'est un groupement qui peut être déprotégé sur charbon palladié (moins coûteux que l'oxyde de platine) et sans appareil de Parr. Dans le schéma ci-dessous est illustré la voie de synthèse :

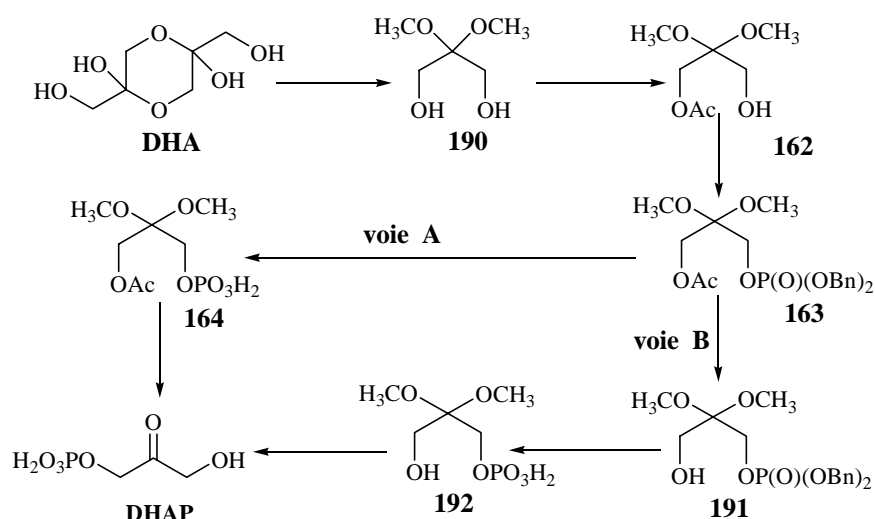


Schéma 52

La cétone de la DHA est protégée sous forme de diméthoxyacétal. Le diol est monoestérifié puis l'alcool restant est phosphorylé pour donner **163**.

A partir du produit **163**, deux voies sont proposées. Dans la voie A, on envisage en premier lieu de déprotéger l'acide phosphorique et en deuxième lieu d'hydrolyser l'ester et l'acétal en une seule étape, comme l'avait décrit M.-L. Valentin dans son article.¹⁰¹ Dans la voie B, nous allons hydrolyser l'ester en première étape puis sans le purifier, enchaîner par l'hydrogénation catalytique et l'hydrolyse de l'acétal.

¹⁰¹ Valentin M.-L. ; Bolte J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 1167.

I.1. Protection de la DHA sous forme d'acétal

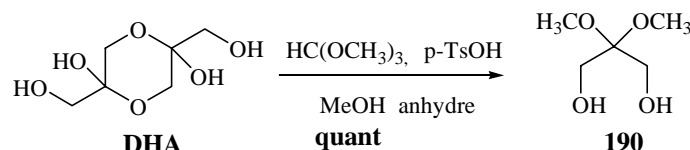


Schéma 53

Pour protéger la fonction cétone, nous utilisons une méthode déjà décrite dans la littérature¹¹⁵ qui consiste en la formation d'un diméthylacétal en milieu acide en présence d'orthoformiate de méthyle dans du méthanol anhydre. Après 24 heures de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est neutralisé par une résine basique et l'acétal **190** brut est isolé. Ce diol peut être distillé sous pression réduite ou purifié par chromatographie mais nous avons choisi de ne pas réaliser de purification à cette étape.

I.2. Mono estérification

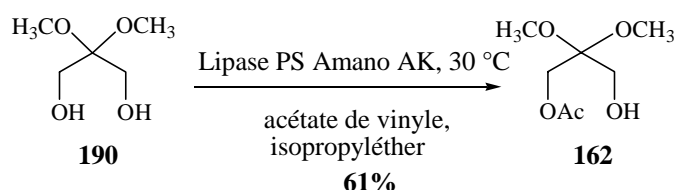
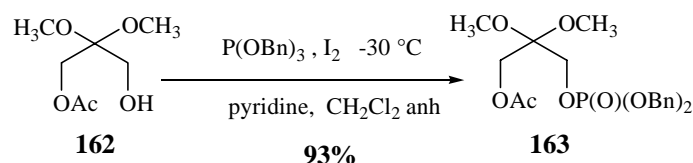


Schéma 54

La lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PSL ou "Amano AK") s'est révélée performante pour la mono fonctionnalisation. Des travaux similaires concernant la désymétrisation de propane-1,3-diols ont été décrits dans la littérature¹¹⁶. On utilise cette enzyme à 2% en masse par rapport au produit **190** brut de l'étape précédente (79 U/mmol de diol). Cette estérification est réalisée dans un mélange acétate de vinyle / isopropyléther (1/1) à 30°C. La réaction est arrêtée dès que l'on voit apparaître une trace de diester en CCM. Le produit est isolé après filtration et purifié soit par chromatographie sur gel de silice, soit par une simple distillation si on travaille sur de grandes quantités. Après distillation, le rendement est de 61% sur deux étapes.

I.3. Phosphorylation du 3-acétoxy-2,2-diméthoxy-propanol



¹¹⁵ Cesarotti E.; Antognazza P.; Pallavicini M.; Villa L. *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2344.

¹¹⁶ Burchardt A.; Takahashi T.; Takeuchi Y.; Haufe, G. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2078.

Schéma 55

La méthode utilisée pour la phosphorylation a été mise en place dans notre laboratoire pour une autre synthèse du DHAP.⁹² L'agent de phosphorylation est l'iodure de dibenzylphosphate, généré *in situ* par action du diiode sur le tribenzylphosphite. L'alcool est ensuite ajouté en présence de pyridine qui catalyse la réaction entre l'alcool et le phosphate. On obtient le produit avec un rendement de 93 %.

I.4. Formation du dihydroxyacétone phosphate (DHAP)

I.4.1. Voie A : hydrogénolyse et hydrolyse

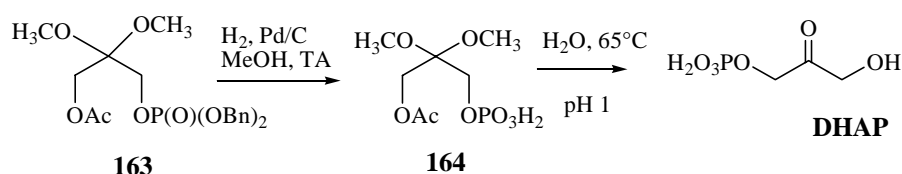


Schéma 56

M.-L. Valentin avait établi cette voie lors de sa thèse.¹⁰¹ Nous l'avons reprise de la même façon. L'hydrogénolyse est effectuée dans du méthanol anhydre en présence de palladium sur charbon. Le produit **164** repris dans l'acide, est chauffé à 65 °C pour hydrolyser l'acétal et l'ester. Le DHAP formé est régulièrement dosé par la glycérolphosphate déshydrogénase, le rendement maximum atteint est de 64 %. Ce résultat est reproductible, obtenu très régulièrement après de nombreux essais. Au-delà d'une heure, le DHAP commence à se décomposer et le rendement diminue considérablement. La courbe correspondante est présentée dans le graphique ci-après (couleur rose).

I.4.2. Voie B

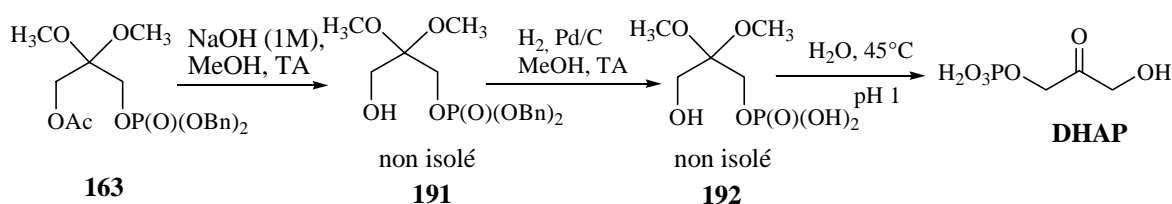


Schéma 57

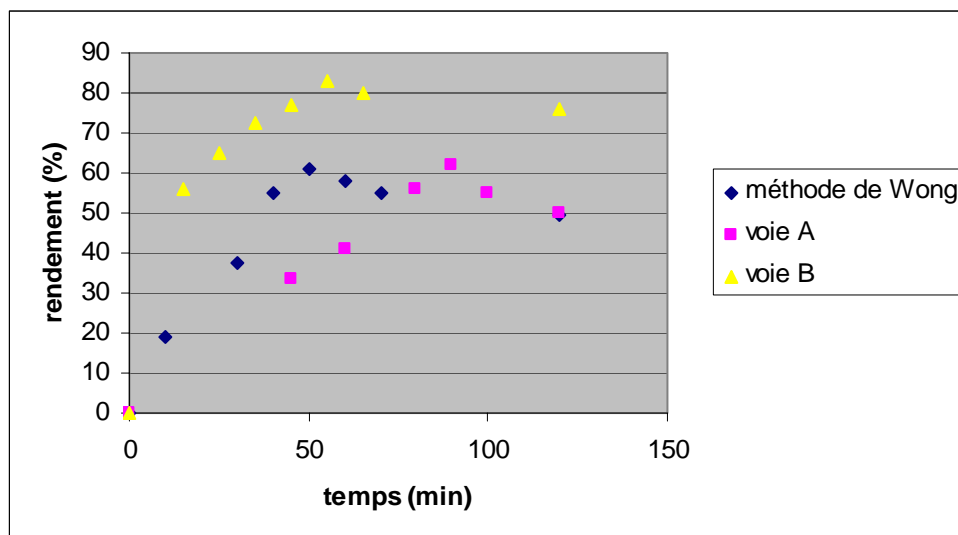
Comme il est généralement admis que les esters sont plus facilement hydrolysés en milieu basique qu'en milieu acide, nous avons envisagé cette réaction pour le produit **163**. Nous avons réalisé la déprotection de la fonction alcool dans du méthanol, en présence de soude 1M. Elle est utilisée en quantité stoechiométrique. L'alcool **192** est ensuite extrait par du CH_2Cl_2 .

⁹² Gefflaut, T. ; Lemaire, M. ; Valentin, M.-L. ; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5920.

¹⁰¹ Valentin M.-L.; Bolte J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 1167.

Le palladium sur charbon est ensuite ajouté à une solution méthanolique contenant **192**. Après 30 min, le catalyseur est éliminé par ultrafiltration et le méthanol évaporé. L'hydrolyse de l'acétal est réalisée à 45 °C à pH 1. La formation du DHAP est suivie par dosage comme précédemment. A cette température, le DHAP est plus stable. Le rendement de 84 % est calculé sur trois étapes à partir de **163**. La courbe de formation du DHAP en fonction du temps est tracée dans un graphique présenté ci-après (couleur jaune).

Nous avons comparé nos résultats avec la méthode de Wong qui procède à l'hydrolyse du précurseur **151** à 65°C (**Schéma 32**). Il s'agit de la méthode la plus employée actuellement par les chercheurs qui utilisent les DHAP aldolases.



Graphique 1
Courbes de dosage du DHAP

Comme on peut le constater, l'hydrolyse du dimère de Wong n'est pas performante, le rendement décrit dans la littérature n'est pas atteint et à 65°C, on constate que le DHAP est très instable. Selon notre voie A, nous n'avons pas pu reproduire non plus les résultats déjà décrits dans la littérature. Il semble donc que procéder à une hydrolyse à cette température ne soit pas un bon choix. La vitesse d'hydrolyse de l'ester ou celle de l'acétal dimère est assez lente et celle en parallèle du phosphate est non négligeable. En revanche, selon la voie B, l'hydrolyse à 45°C est plus rapide car il n'y a que le diméthoxyacétal à hydrolyser. Cela permet d'atteindre le rendement maximum de 84 % en 50 min, le DHAP se décomposant nettement moins rapidement à 45°C. Nous avons donc trouvé un bon compromis entre la vitesse d'hydrolyse des protections et la vitesse de décomposition du DHAP. De plus, par RMN du ^{13}C et ^{31}P nous n'avons pas relevé d'autres impuretés que le méthanol. Il n'y a pas (ou très peu) de phosphate inorganique. Ce qui n'est pas le cas dans les échantillons analysés provenant des deux autres méthodes. La voie B est clairement la meilleure méthode pour préparer le DHAP.

En conclusion, notre synthèse a impliqué une distillation, une chromatographie et a été réalisée à partir de produits commerciaux d'un coût largement abordable. Le rendement global à partir de la DHA s'élève à 47 %. La solution concentrée de DHAP obtenue peut être congelée et conservée plusieurs mois. Il peut aussi être préparé le jour même à partir du produit **163** qui correspond à un composé de stockage stable.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue Journal of Organic Chemistry en 2004¹¹⁷.

II. Synthèses des aldéhydes nitrés

II.1. Schéma général

Nous avons envisagé la préparation des différents aldéhydes nitrés en position 4 possédant 0, 1 ou 2 groupements hydroxyles selon le schéma résumé ci-dessous.

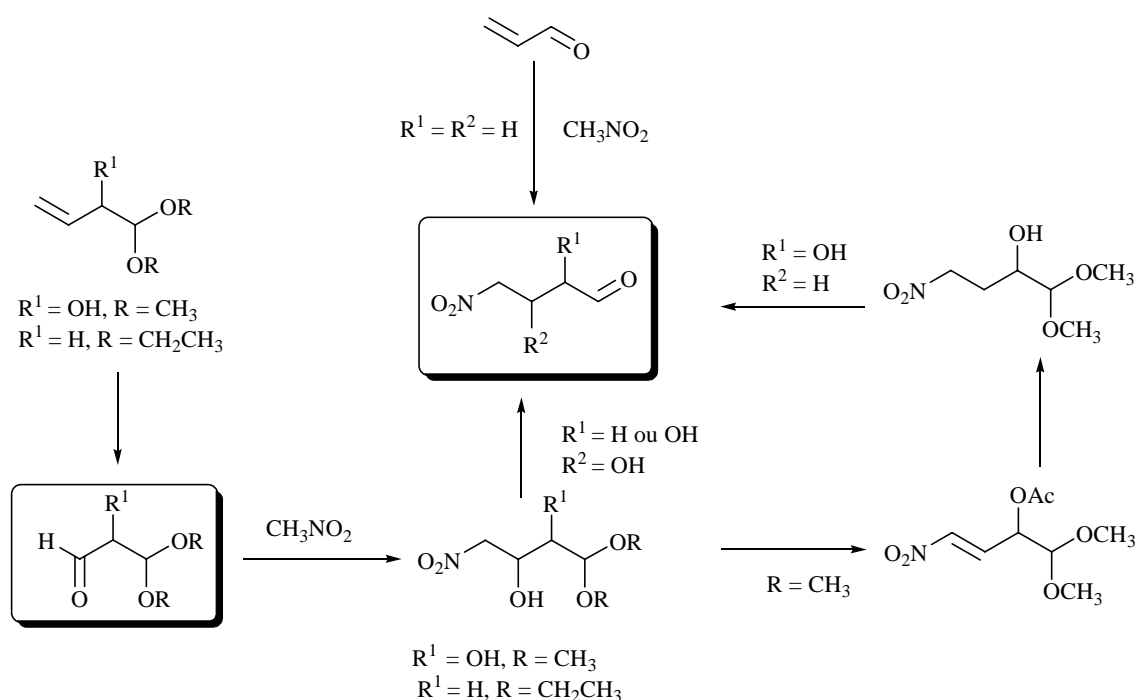


Schéma 58

Dans le cas où $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$, il s'agit simplement d'une réaction de Michael mettant en jeu l'acroléine et le nitrométhane, ce qui permettra de préparer directement le 4-nitrobutanal. Les aldéhydes nitrés portant au moins un groupement hydroxyle, pourront être formés par déprotection en milieu acide d'une fonction acétal. L'introduction du groupement $-\text{NO}_2$ sera effectuée selon une réaction de Henry (nitroalkylation d'un carbonyle en milieu basique) mettant en jeu le nitrométhane et un aldéhyde.

Dans un premier temps, les synthèses seront réalisées avec des hydroxyaldéhydes racémiques afin d'évaluer leur qualité de substrats vis-à-vis de la FBA. Dans un deuxième temps, ces aldéhydes seront dédoublés par voie enzymatique à l'aide de lipases. Ainsi, les synthèses pourront être poursuivies avec des composés optiquement purs, ce qui permettra notamment de simplifier les étapes de purification des différents stéréoisomères formés via l'aldolase.

¹¹⁷ Charmantray, F. ; El Blidi, L. ; Gefflaut, T. ; Hecquet, L. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2951.

II.2. Dédoublément enzymatique

Les enzymes constituent un groupe particulièrement important de catalyseurs chiraux. La catalyse enzymatique est fondée sur une adaptation tridimensionnelle de la molécule dans un site actif, permettant souvent un degré élevé de sélectivité entre deux stéréoisomères. Les enzymes les plus faciles d'utilisation sont celles qui catalysent l'hydrolyse des esters (estérases, lipases). Elles sont couramment employées pour réaliser des dédoubléments de composés racémiques ou des désymétrisations.

Dans le cas d'un dédoublément cinétique enzymatique, deux réactions sont en compétition.

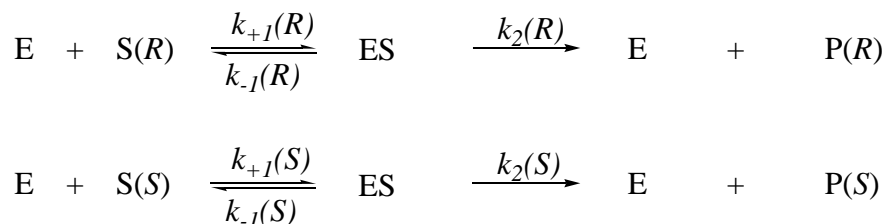


Schéma 59

Les vitesses de transformation sont différentes pour chacun des énantiomères. On définit le coefficient d'énantiosélectivité E comme le rapport de ces vitesses :

$$E = \frac{V_R}{V_S} = \frac{\left(\frac{k_2}{K_m}\right)_R}{\left(\frac{k_2}{K_m}\right)_S}$$

Équation 1

Les vitesses apparentes V_R et V_S ne sont accessibles que si l'on dispose déjà des énantiomères purs, et ne sont pas toujours faciles à déterminer. Sih et coll¹¹⁸ ont montré que E était lié à l'excès énantiomérique (ee) des substrats et des produits ainsi qu'au taux de conversion c (degré d'avancement de la réaction). Les équations suivantes sont utilisées.

$$E_{\text{sub}} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_{\text{sub}})]}{\ln[(1-c)(1+ee_{\text{sub}})]} \quad E_{\text{prod}} = \frac{\ln[1-c(1+ee_{\text{prod}})]}{\ln[1-c(1-ee_{\text{sub}})]}$$

Équation 2

Ces expressions sont valables dans le cas où la réaction est irréversible. Le rapport E caractérise l'efficacité de l'enzyme pour le dédoublément cinétique d'un substrat donné. La connaissance du coefficient d'énantiosélectivité permet de savoir à quel taux de conversion on doit s'arrêter pour avoir un excès énantiomérique donné.

Les excès énantiomériques et l'avancement d'une réaction peuvent être déterminés par plusieurs techniques. Nous avons choisi les techniques chromatographiques en phase chirale. La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont deux méthodes de choix pour la détermination des excès énantiomériques. Elles possèdent les mêmes avantages : vitesse, sensibilité et simplicité.

¹¹⁸ Chen, C.-S. ; Fujimoto, Y. ; Girdaukas, G. ; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1294.

Nous avons envisagé de séparer et analysé le mélange d'énantiomères à l'aide d'une colonne à support chiral. Les interactions qui se créent entre la phase stationnaire et les substrats expliquent les temps de rétention différents.

II.3. Synthèse du 4-nitrobutanal

L'aldéhyde **193** est obtenu par une réaction d'alkylation entre l'acroléine et le nitrométhane en milieu basique faible.

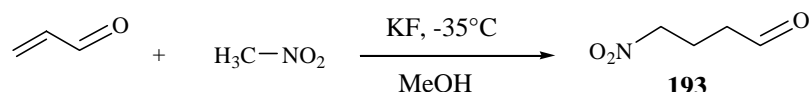


Schéma 60

Bien que des modes opératoires décrits dans la littérature détaillaient la préparation de cet aldéhyde¹¹⁹, nous avons dû reprendre cette réaction dans d'autres conditions car nos résultats n'étaient pas satisfaisants.

En travaillant à basse température, en présence d'un grand excès de nitrométhane et en milieu basique faible (KF) l'aldéhyde désiré se forme de façon majoritaire. D'autres conditions testées nous avaient souvent conduits à une double alkylation en alpha du nitro. Cet aldéhyde **193** ne peut pas être purifié par chromatographie sur gel de silice, car il se produit une réaction secondaire d'aldolisation intermoléculaire. Il faut le distiller sous pression réduite. On obtient l'aldéhyde pur avec un rendement de 56 %.

II.4. Synthèses des aldéhydes (pour la réaction de Henry)

II.4.1. Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal 195

Le schéma réactionnel est le suivant :

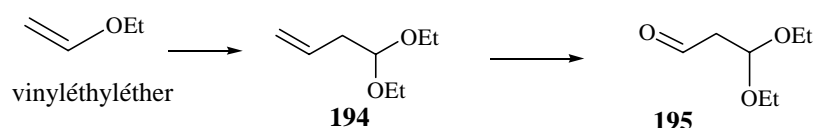


Schéma 61

II.4.1.a. Synthèse du 4,4-diéthoxybut-1-ène 194

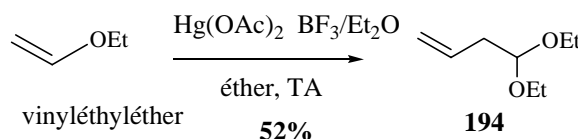


Schéma 62

¹¹⁹ (a) Kimura, R.; Nagano, T.; Kinoshita, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, 75, 2517–2525. (b) Shechter, H.; Ley, D. L.; Zeldin, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3664–3668. (c) Knefeli, F.; Mayer, K. K.; Poettinger, T.; Stoeber, G.; Wiegrebe, W. *Archiv. Pharm.* **1983**, 316, 773–781.

Nous avons appliqué les conditions décrites par Montagna en 1958¹²⁰. Les éthers α , β -insaturés se polymérisent très facilement lorsqu'ils sont mis en présence d'acétate mercurique et de trifluorure de bore.

Le vinyléthyléther est additionné à un mélange d'acétate mercurique et de trifluorure de bore dans l'éther. La température est maintenue entre 40 et 50°C durant 2 h. Le produit **194** est purifié par distillation sous pression réduite et isolé avec un rendement de 52%.

II.4.1.b. Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal **195**

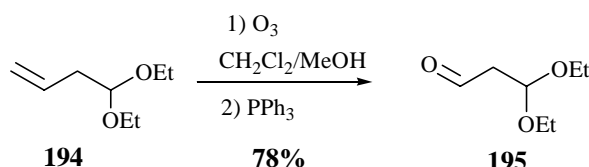


Schéma 63

Cette réaction d'oxydation est décrite dans la littérature.¹²¹ Le 4,4-diéthoxybut-1-ène **194** est ozonolysé dans un mélange MeOH/dichlorométhane, sous courant d'ozone à -78 °C. Lors de cette réaction, il y a tout d'abord formation d'un ozonide qui est réduit en carbonyle par action de la triphénylphosphine. Nous avons privilégié l'emploi de ce réducteur plutôt que celui du diméthylsulfure plus classique car la réaction de réduction est nettement plus rapide. Le produit **195** est purifié par chromatographie éclair et obtenu avec un rendement de 78%.

II.4.2. Synthèse du 2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal **198**

Le schéma réactionnel pour la préparation de cet aldéhyde est représenté ci-dessous :

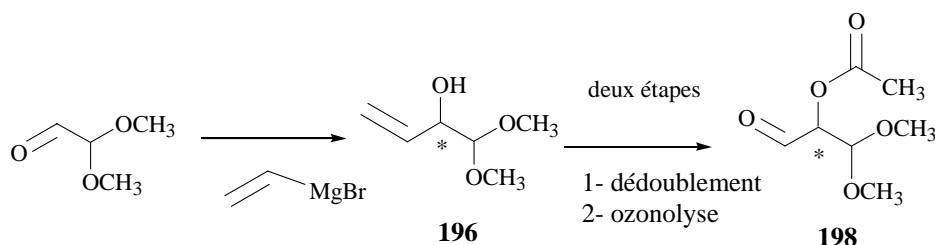


Schéma 64

II.4.2.a. Synthèse du 1,1-diméthoxybut-3-én-2-ol **196**

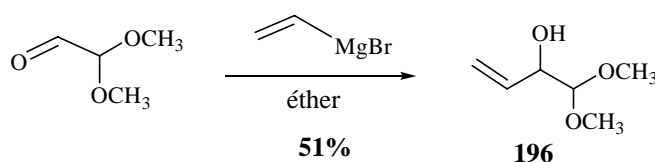


Schéma 65

¹²⁰ Hoaglin, R. I.; Kubler, D. G.; Montagna, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 5460.

¹²¹ Trost, B. M.; Dumas, J.; Villa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9836.

Cette réaction a aussi été décrite dans la littérature.¹²² L'alcène **196** est préparé par une réaction de Grignard entre le vinylmagnésium en solution 1M dans le THF et le diméthylacétal du glyoxal en présence d'iode. La réaction conduit à un rendement de l'ordre de 51 %.

II.4.2.b. Dédoublage enzymatique du 1,1-diméthoxybut-3-èn-2-ol **196**

Afin de faciliter la séparation des futurs stéréoisomères, formés lors de l'étape de la réaction d'aldolisation entre le DHAP et un aldéhyde, nous avons réalisé ce dédoublage par transestérification.

Concernant l'énantiopréférence des lipases, Kazlauskas¹²³ a proposé une règle empirique permis de prédire quel énantiomère d'un alcool secondaire réagit plus rapidement dans une réaction catalysée par une lipase. Elle se base sur la taille des substituants. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs réussi à améliorer l'énantiosélectivité en augmentant la différence de taille entre deux substituants d'un alcool secondaire. De la même façon, d'autres ont pu inverser l'énantiosélectivité en transformant le groupement de taille moyenne en groupement plus volumineux. L'énantiomère favorisé par les lipases, pour un hydroxyle pointant vers l'avant, est l'énantiomère possédant le groupement le plus volumineux à droite (**Figure 34**).

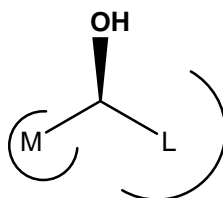


Figure 34

Dans le cas de notre alcool allylique, le groupement le plus volumineux est la partie acétal de la molécule. On peut donc s'attendre à ce que les lipases reconnaissent mieux l'énantiomère (*R*).

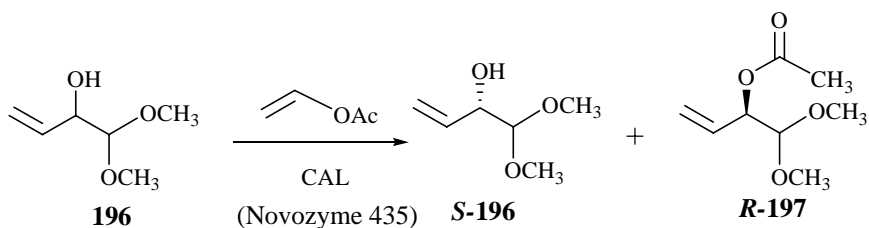


Schéma 66

La résolution enzymatique de cet alcène a été étudiée et optimisée dans notre laboratoire par S. Gravil, nous avons repris ces travaux en introduisant de légères modifications.¹²⁴ Ainsi, l'enzyme qui avait donné de bons résultats était une lipase de *Candida antartica* (lipase B). L'enzyme utilisée par S. Gravil n'étant plus accessible, nous nous sommes orientés vers celle commercialisée par Novonordisk, sous le terme Novozyme 435. Il s'agit de la lipase B

¹²² Kobori, Y. ; Myles, D. C. ; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5899.

¹²³ Bornscheuer, U.T. ; Kaslauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis* **1999**, VCH: Weinheim.

¹²⁴ Chênevert, R. ; Gravil, S. ; Bolte, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 2081.

immobilisée sur support solide. Nous y avons vu aussi l'avantage de pouvoir recycler le catalyseur plusieurs fois.

L'acétate de vinyle est employé comme donneur d'acétate et comme solvant. L'enzyme et le substrat sont utilisés en quantités proportionnelles. Après 20 heures de réaction, l'ester formé et l'alcool restant sont séparés par chromatographie éclair et les excès énantiomériques sont mesurés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) chirale. On obtient :

Pour l'alcool, rendement : 46% et l'ee > 98%

Pour l'ester, rendement : 43% et l'ee = 98%

Cela correspond à un E > 200.

L'enzyme peut être recyclée 4-5 fois voire plus, la vitesse de la réaction ne diminue que très légèrement à chaque fois.

Nos résultats, avec cette forme commerciale de la lipase de *Candida antarctica*, sont donc identiques à ceux de S. Gravil.

II.4.2.c. Synthèse du (1S) acétate de (1,1-diméthoxyméthyl)prop-2-ényle S-197

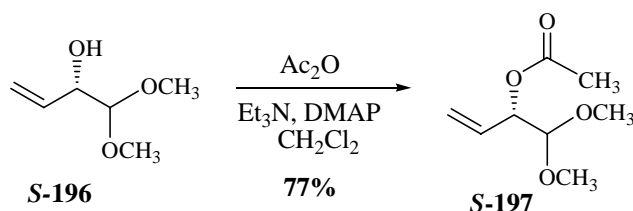


Schéma 67

Avant l'ozonolyse, l'alcène **S-196** a été estérifié chimiquement par action de l'anhydride acétique en présence de triéthylamine et de DMAP dans CH_2Cl_2 avec un rendement de 77%. Cette estérification permet d'isoler le produit de l'ozonolyse en facilitant l'étape de purification (polarité moins élevée de l'acétate), alors qu'avec la fonction alcool non protégée, l'aldéhyde doit être utilisé directement sans purification dans l'étape suivante. En conséquence, la présence d'oxyde triphénylphosphine issu de la réduction de l'ozonide rend la purification du nitroalcool trop difficile.

II.4.2.d. Synthèse des (2R) et (2S)-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal R-198 et S-198

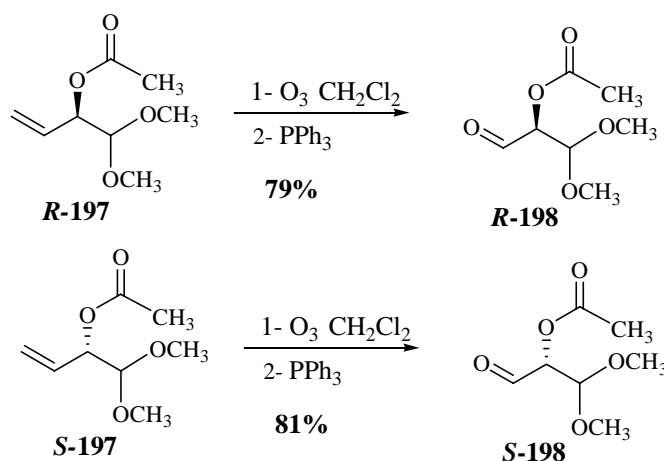


Schéma 68

La double liaison de l'alcène **R-197** a été oxydée dans les mêmes conditions que l'alcène **194**. Ainsi l'aldéhyde **R-198** a été obtenu avec un rendement de 79 % après purification par chromatographie éclair. Les données de la RMN montrent la disparition des signaux éthylénique (118 et 130 ppm) et l'apparition d'un signal à 195 ppm caractéristique des aldéhydes.

Selon le même protocole, l'aldéhyde **S-198** a été préparé avec un bon rendement, à partir de l'alcène **S-197**.

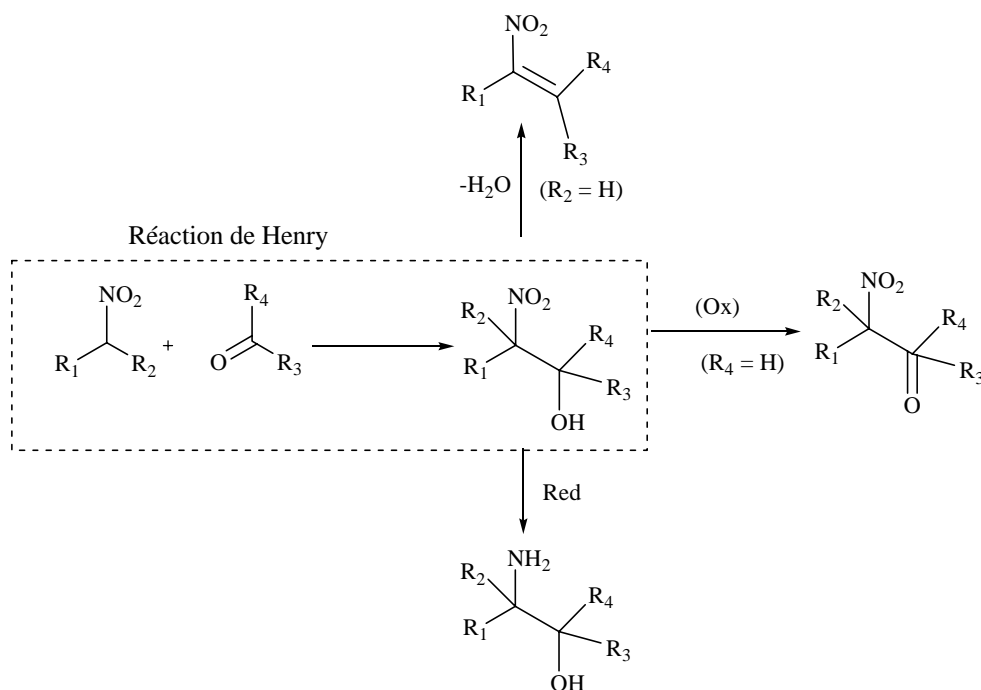
Les mêmes modifications RMN pour l'énantiomère **R-198** ont été aussi observées pour l'aldéhyde **S-198**.

II.5. Synthèses des nitroalcools

II.5.1. Brefs rappels sur la réaction de Henry

II.5.1.a. Introduction

La réaction de Henry ou nitroaldolisation est l'une des réactions les plus classiques en synthèse organique pour former des liaisons carbone-carbone par couplage entre un carbonyle et un nitroalcane α -hydrogéné, formant ainsi des β -nitroalcools avec la création d'un ou deux centres asymétriques¹²⁵. Elle permet aussi de coupler facilement deux fragments moléculaires dans des conditions douces. Le nitroalcool formé peut subir une oxydation, une réduction ou une déshydratation selon les différents objectifs de la synthèse.



¹²⁵ (a) Henry, L. C. R. Acad. Sci. Ser. C. **1895**, 120, 1265 ; (b) Luzzio, F. A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 915.

II.5.1.b. Catalyseurs généraux de la réaction de Henry

Cette réaction peut être catalysée par des bases organiques, des bases inorganiques éventuellement sous forme de sels quaternaires d'ammonium dans des solvants protiques et aprotiques. Ces conditions dépendent des fonctions des réactifs et de la solubilité du nitronate généré. Le nitroalkane est souvent utilisé en excès afin d'éviter l'autocondensation aldolique ou l'épimérisation dans le cas d'un aldéhyde. Dans ces conditions basiques, d'autres réactions secondaires sont aussi favorisées, notamment la rétroaldolisation et la réaction de Canizzaro. Dans les solvants alcooliques et aqueux, la nitroaldolisation est catalysée par des alkoxydes et des hydroxydes.

Afin de surmonter ces problèmes plusieurs catalyseurs ont été développés comme par exemple le 1,1,3,3-tetraméthylguanidine (TMG) et ses analogues neutralisés par l'acide trifluoroacétique ou l'acide lactique, en présence d'un grand excès de nitroalkane. Ces catalyseurs sont recyclables et facilement éliminés¹²⁶. L'hydroxyde de cetyltriméthylammonium (CTAOH) est un bon catalyseur hétérogène de l'addition de Michael et de la condensation de Henry. Les réactifs sont utilisés en quantité stoechiométriques¹²⁷. Récemment, avec le développement des catalyseurs de transfert de phase, des catalyseurs de la réaction de Henry immobilisés sur une matrice polymérique ont été développés comme le chlorure de triéthyl ou tributylammonium (PsTEAC) et (PsTBAC) sur un support de polystyrène. Ces catalyseurs sont recyclable et fonctionnent en milieu aqueux¹²⁸. Ils ont été testés sur des aldéhydes aromatiques en présence du nitrométhane et du nitroéthane.

II.5.1.c. Catalyseurs asymétriques

Avec l'objectif de préparer des aminoalcools optiquement enrichis et comme la réduction du dérivé nitré correspondant donne de bons rendements, de considérables efforts ont été portés vers le développement de catalyseurs asymétriques pour la réaction de Henry¹²⁹. Nous avons choisi de présenter un seul exemple, la synthèse du *threo*-dihydrosphingosine **203** catalysée par un dérivé du samarium de (*R*)-(+)-Binol¹³⁰ **201**.

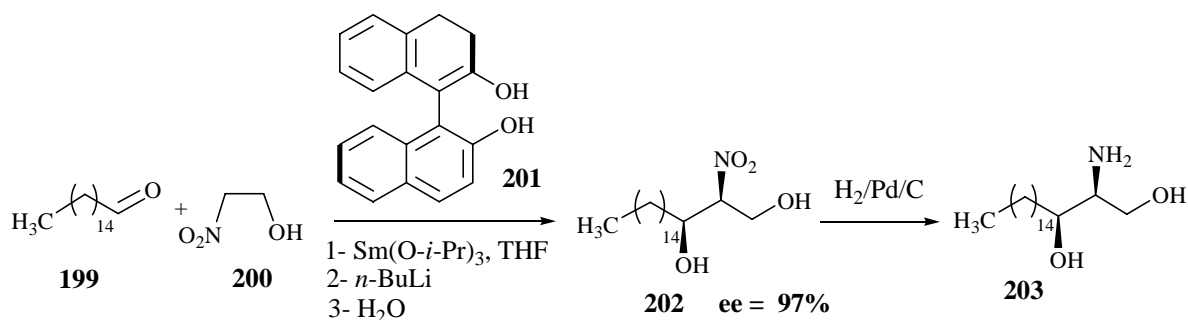


Schéma 70

¹²⁶ Jiang, T. ; Gao, H. ; Han, B. ; Zhao, G. ; Chang, Y. ; Wu, W. ; Gao, L. ; Yang, G. *Tetrahedron Lett* **2004**, 45, 2699.

¹²⁷ Ballini, R. ; Fiorini, D. ; Victoria, M. G. ; Palmieri, A. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2799.

¹²⁸ Wang, Z. ; Xue, H. ; Wang, S. ; Yuan, C. *Chemistry and Biodiversity* **2005**, 2, 1195.

¹²⁹ (a) Trost, B. M. ; Yeh, V. S. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 861. (b) Evans, D. A. ; Seidel, D. ; Rueping, M. ; Lam, H. W. ; Shaw, J. T. ; Downey, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12692.

¹³⁰ Sasai, H. ; Tokunaga, T. ; Watanbe, S. ; Suzuki, T. ; Itoh, N. ; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7388.

L'étape clef de cette synthèse est la formation de l'intermédiaire **202** avec la formation stéréosélective d'une liaison carbone-carbone.

II.5.1.d. Réaction de Henry intramoléculaire

Plusieurs exemples de nitroaldolisation intramoléculaire ont été décrits dans la littérature. Dans le cas de cette réaction, il est nécessaire de préparer des précurseurs de type nitrocarbonyles possédant à la fois un nucléophile et un électrophile chacun en bout de chaîne. Ces composés donnent alors un 2-nitro-alkanol cyclique (**Schéma 71**). Les préparations performantes de ces précurseurs bifonctionnels ne sont pas si évidentes, car il faut envisager l'ajustement simultané des degrés d'oxydation du carbone et de l'azote. C'est un domaine où des améliorations peuvent encore être apportées.^{125b}

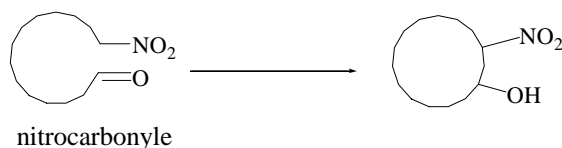


Schéma 71

Cette cyclisation est souvent stéréosélective, un stéréoisomère est formé seul ou très majoritairement. Nous avons choisi deux exemples qui devraient permettre d'alimenter notre propre discussion par la suite. Nous n'avons pas trouvé de situation identique à la nôtre, avec condensation d'une cétone et d'un dérivé nitré. Tous les exemples ont concerné des aldéhydes.

➤ Estévez et coll ont préparé un dérivé du *myo*-inositol à partir du D-glucose¹³¹. L'étape clef de cette synthèse est une réaction intramoléculaire stéréosélective de type Henry, permettant de former le cycle à six chaînons (**Schéma 72**).

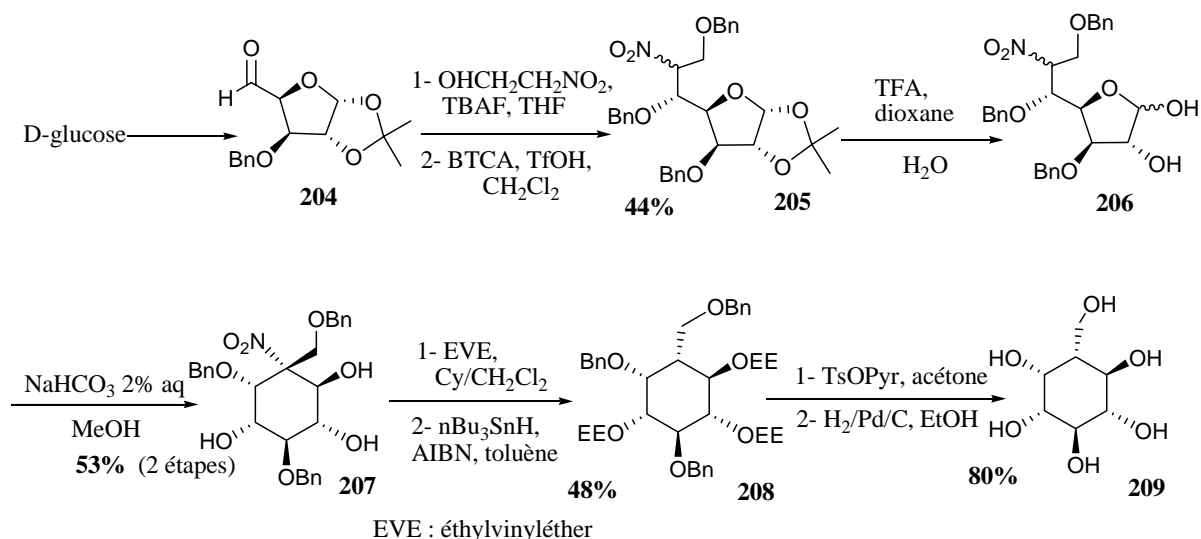


Schéma 72

^{125b} Luzzio, F. A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 915.

¹³¹ Soengas, R. G. ; Estévez, J. C. ; Estévez, R. J. *Org. Lett.* **2003**, 5, 4457.

Le dérivé nitré **205** a été préparé à partir de l'aldéhyde **204** par une réaction de Henry en présence de nitroéthanol. Le traitement de **206** par du bicarbonate de sodium permet la formation diastéréospécifique du composé **207**. Ensuite le groupement nitro est éliminé par réduction radicalaire ; deux déprotections ont permis l'isolement du dérivé du *myo*-inositol **209**.

Concernant la stéréosélectivité de la cyclisation, les auteurs suggèrent le mécanisme suivant :

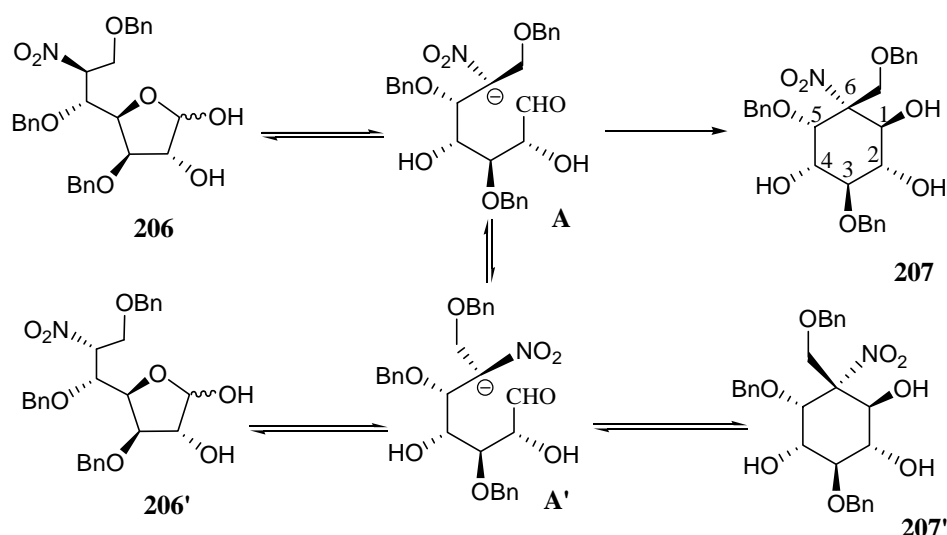


Schéma 73

Le carbanion **A'** issu du dérivé **206'** peut donner le cyclitol **207'** mais comme il existe un équilibre entre les deux carbanions **A** et **A'**, on obtient le cyclitol **207**. La NOESY de ce dernier a montré que le NO₂ est en position équatoriale, les OBn des C₃ et C₅ sont respectivement en position équatoriale et axiale et les OH sont en position équatoriale. Les auteurs considèrent que ce conformère est le plus stable thermodynamiquement car les deux groupements volumineux en position 1 et 6 sont *trans*. Nous sommes surpris que l'on puisse considérer le groupement NO₂ comme plus volumineux que CH₂OBn, car la valeur de A pour le NO₂ (1,06 kcal/mol) est inférieure à celle du CH₂OBn (environ 1,8 kcal/mol).[£]

➤ L'une des étapes clés de la synthèse du cétolactame de Kishi est une double réaction de Henry stéréosélective entre le glutaraldéhyde et le nitroacétal **208**¹³² (Schéma 74). Dans ce cas aussi, un seul stéréoisomère *meso* est isolé. Les deux liaisons formées donnent une disposition *trans* des substituants. La réaction est sous contrôle thermodynamique car c'est le stéréoisomère qui présente le moins d'effets stériques et stéréoélectroniques qui est formé.

¹³² Luzzio, F. A. ; Fitch, R. W. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5493.

[£] <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/Handouts/a-values/a-values.htm>

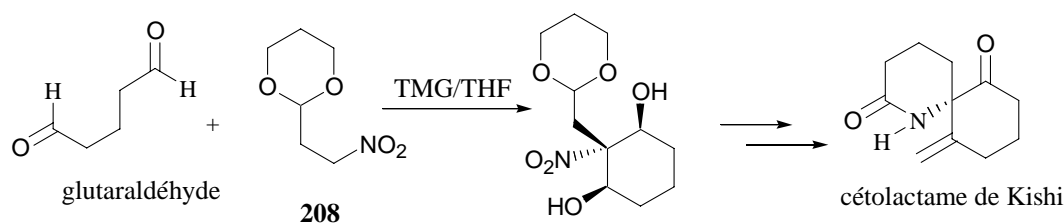


Schéma 74

Une étude plus générale a été réalisée en faisant varier la nature de R (**Schéma 75**). Pour expliquer la formation d'un seul stéréoisomère, les auteurs ont proposé, selon la taille du groupement R, les conformations des états de transition. Pour un R petit (H, CH₃), le NO₂ occupe une position pseudo équatoriale et l'aldéhyde est en position pseudo équatoriale, donnant ainsi avec l'hydroxyle de la première réaction de Henry, une forme *meso*. Dans le cas où R est volumineux, la conformation adoptée par l'état de transition oriente R en position équatoriale à cause des effets stériques exigeant ainsi, une orientation pseudo axiale du carbonyle. Le 1,3-dioxane représente l'exception à cette règle car malgré sa taille, il s'oriente en position pseudo axiale. Après la première réaction d'aldolisation, une liaison hydrogène est établie entre l'hydrogène de l'hydroxyle formé et l'oxygène du dioxane provoquant ainsi, l'orientation du groupement dioxanyle en position pseudoaxiale.

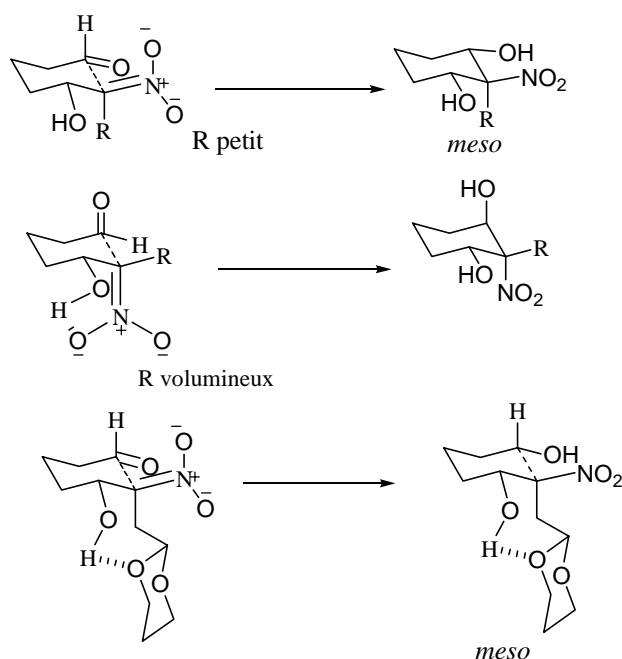


Schéma 75

II.5.2. Synthèse du 4,4-diéthoxy-1-nitrobutan-2-ol 209

II.5.2.a. Synthèse en version racémique

Nous avons choisi de travailler avec l'hydroxyde de sodium comme base dans l'éthanol selon une procédure décrite dans la littérature¹³³.

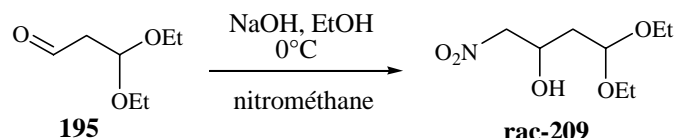


Schéma 76

La réaction d'alkylation du nitrométhane sur l'aldéhyde **195** en milieu basique permet de préparer le produit racémique **209**. Le nitronate est formé à 0 °C sous forte agitation afin d'éviter la formation d'un précipité puis l'aldéhyde est ajouté. Après neutralisation, le produit est isolé et purifié par chromatographie éclair avec un rendement de 86 %.

Les spectres RMN du ¹H et ¹³C sont en accord avec la structure proposée et montrent la disparition du signal de l'aldéhyde et l'apparition d'un multiplet à 4,57 ppm correspond au CH₂NO₂.

II.5.2.b. Dédoublément cinétique enzymatique

Comme l'aldolase n'est pas toujours énantiosélective vis-à-vis des aldéhydes, il est souhaitable, pour simplifier les procédures de purification, de travailler avec des substrats optiquement purs. Pour cela, nous avons dédoublé l'acétal **209** à l'aide d'une lipase.

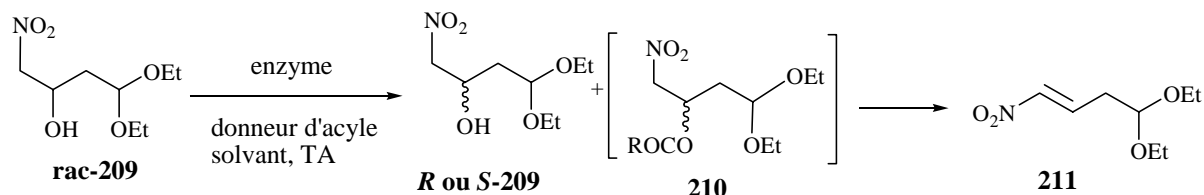


Schéma 77

Ce travail sur **209** n'a jamais été décrit dans la littérature. En revanche, d'autres dérivés 1-nitroalkan-2-ols ont été dédoublés par réaction de transestérification.¹³⁴

Trois enzymes lipase PS (Amano AK, *Pseudomonas fluorescens*), lipase PC (Amano PS, *Burkholderia cepacia*) et la lipase B de *Candida antartica* ont été choisies pour le criblage. Elles font partie des enzymes les plus performantes pour dédoubler des alcools secondaires.

Les résultats de nos expériences sont regroupés dans le **Tableau 6**.

¹³³ Lucet, D. ; Sabelle, S. ; Kostelitz, O. ; Le Gall, T. ; Mioskowski, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2583.

¹³⁴ Sorgedragner, M. J. ; Malpique, R. ; Rantwijk, V. F. ; Shedon, R. A. *Tetrahedron: asymmetry* **2004**, 15, 1295.

essai	enzyme	molarité	donneur	solvant	t(d)	ee _s (%) ^a	c(%) ^a	E
1	CAL-B ^b	0,483	acétate de vinyle ^d	TBME	6	55	60	3,6
2	PSL ^b	0,483	acétate de vinyle ^d	TBME	pas de réaction	-	-	-
3	PCL ^b	0,483	acétate de vinyle ^d	TBME	pas de réaction	-	-	-
4	CAL-B ^b	0,483	acétate de vinyle ^d	DIPE	10	86	55	15
5	CAL-B ^b	0,483	acétate de vinyle ^d	acétate de vinyle	10	25	30	-
6	CAL-B ^b	0,483	acétate de vinyle ^d	CH ₂ Cl ₂	pas de réaction	-	-	-
7	CAL-B ^b	0,483	anhydride succinique ^d	DIPE	pas de réaction	-	-	-
8	CAL-B ^b	0,483	butyrate de vinyle ^d	DIPE	7	97	52	75
9	CAL-B ^b	0,483	palmitate de vinyle ^d	DIPE	7	9	24	-
10	CAL-B ^c	0,120	butyrate de vinyle ^e	DIPE	2	92	50	78

a : déterminé par HPLC chirale en utilisant un standard interne, 1,3,5-triméthoxybenzène

b : rapport de masse alcool : enzyme (1 : 2,5)

c : rapport de masse alcool : enzyme (1 : 4)

d : 1,2 équivalents

e : 2 équivalents

Tableau 6

L'excès énantiomérique (ee), le taux de conversion (c) et le coefficient d'énantioselectivité ont été déterminés par HPLC chirale (colonne chirale OD) en présence d'un standard interne (1,3,5-triméthoxybenzène).

Dans un premier temps, nous avons testés les trois enzymes en présence de l'acétate de vinyle comme agent acylant dans le tertbutylméthyléther (essais 1-3). A l'issue de ce criblage, seule la CAL-B (Novozym 435) a permis l'acylation de l'alcool, nous avons, donc retenu cette enzyme pour la suite de cette étude.

Dans un deuxième temps, différents solvants ont été testés (essais 4-6), le diisopropyléther (DIPE) a donné le meilleur résultat (essai 4). Il n'y a pas de réaction dans le solvant chloré(essai 6).

Dans un troisième temps, nous avons testé différents donneurs (essais 7-9).

Dès le départ de ce travail, nous avons constaté que l'ester **210** formé donne spontanément le produit d'élimination. Ainsi la majorité de l'ester est transformé en alcène **211** (**Schéma 77**). Ce résultat a été aussi observé par Sheldon et coll¹³⁴ notamment pour un composé possédant un groupement phényle à la place de la fonction acétal de **209**. L'ester **210** est observé par HPLC sous conditions anhydres dans le milieu réactionnel, mais toute tentative de traitement ou purification a donné majoritairement l'alcène **211**.

¹³⁴ Sorgedragger, M. J. ; Malpique, R. ; Rantwijk, V. F. ; Sheldon, R. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 1295.

C'est pourquoi, nous avons tourné notre attention vers l'influence du donneur d'acyle, en choisissant des esters avec de longues chaînes (essais 7-9) qui permettraient de limiter la réaction d'élimination. L'anhydride succinique n'a donné aucune réaction, phénomène aussi constaté par Sheldon et coll, pour le même produit cité précédemment¹³⁶. Malheureusement ces essais sont restés infructueux et nous n'avons pas trouvé un moyen de limiter cette réaction parasite d'élimination.

La meilleure valeur de E a été obtenue avec le butyrate de vinyle dans le DIPE (essai 8). Tous les essais 1-9 étant analytiques, pour préparer l'alcool **209** optiquement enrichi à l'échelle préparative (1 g), nous avons travaillé avec plus d'enzyme et de donneur d'acyle (essai 10). L'alcool a été obtenu avec un rendement de 50% et un ee de 92% correspondant à un E de 78.

D'après l'énantiopréférence de l'enzyme discutée précédemment (paragraphe II.4.2.b), nous nous attendons à une meilleure reconnaissance de l'énantiomère **S-209** (Figure 35). Donc, l'énantiomère non estérifié par l'enzyme est le **R-209**. Cette configuration a été aussi confirmée par corrélation chimique en couplant l'aldéhyde (produit de la déprotection du **R-209**) et le DHAP en présence l'aldolase (voir paragraphe III, Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

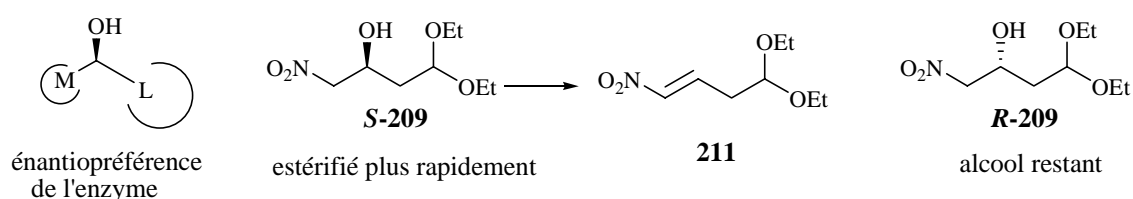


Figure 35

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une partie d'un article qui vient d'être récemment accepté pour publication.¹³⁵

II.5.3. Synthèse du 1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol

II.5.3.a. Synthèse du (2R)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol (2R)-212

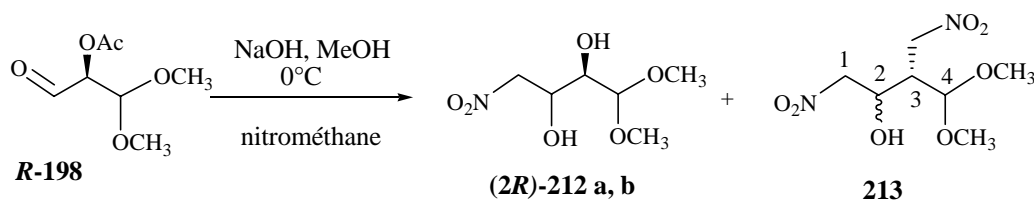


Schéma 78

Nous avons appliqué la même procédure que lors de la préparation de **209** en remplaçant l'éthanol par le méthanol.

La réaction d'aldolisation a donné les nitrodiols (2R)-212 a et b désirés sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères non séparables par chromatographie sur gel de silice et un produit secondaire **213**, produit de substitution nucléophile de l'acétoxy par le

¹³⁵ El Blidi, L. ; Ahbala, M. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 2684.

méthylnitronate. Bien que cette substitution soit moins favorable que la réaction d'addition, la présence de la totalité du nitronate dès le début de la réaction occasionne la formation de **213**. Les deux produits ont été séparés par chromatographie éclair. Dans ces conditions, on obtient le nitrodiol avec un rendement de 56 % et le produit de la substitution avec un rendement de 10 %.

Afin d'éviter la formation du produit **213**, nous avons préparé le nitronate en solution dans le méthanol puis il a été additionné goutte à goutte à une solution de l'aldéhyde **R-198** à 0°C. Dans ces conditions, on forme uniquement les nitrodiols avec un rendement de 61 %.

Les données spectroscopiques obtenues pour ce mélange sont conformes à la structure proposée (masse haute résolution : $[M+Na]^+ = 218,0641$). Les spectres infrarouge et de RMN montrent la disparition des groupements de l'aldéhyde et l'apparition du groupement nitro. Ce mélange de diastéréoisomères présente un pouvoir rotatoire spécifique de -6,8 ($c = 1,1$; $CHCl_3$).

Les spectres RMN de **212** montrent que les deux diastéréoisomères (**2R**)-**212 a** et (**2R**)-**212 b** sont présents dans la proportion 1 : 1. Nos conditions réactionnelles et la structure de l'aldéhyde n'induisent pas de stéréosélectivité de la réaction de Henry.

Les données de la RMN du produit **213** montrent la présence de deux groupements CH_2NO_2 non dédoublés et le C2 sous forme d'un seul signal, on peut donc supposer l'existence d'un seul stéréoisomère. Dans ce cas, la réaction de Henry est apparemment stéréosélective. Cette stéréosélectivité peut être liée à la réaction de substitution nucléophile. Celle-ci en ayant lieu avant l'alkylation, formerait un aldéhyde intermédiaire dont la structure favoriserait l'induction asymétrique pour la réaction de Henry. Comme il s'agit d'un sous-produit, nous n'avons pas cherché à déterminer les configurations absolues. Sa structure a été confirmée par une masse exacte masse ($[M+Na]^+ = 230,0632$).

II.5.3.b. Synthèse du (2S)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol (2S)-212

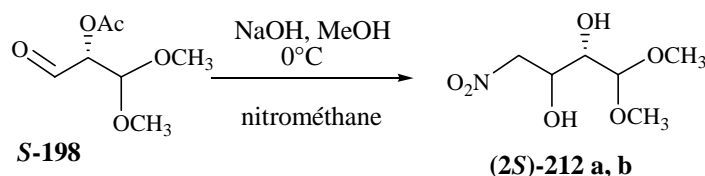


Schéma 79

Nous avons suivi la procédure qui a donné uniquement le nitrodiol (**2R**)-**212** pour préparer le nitrodiol (**2S**)-**212**. Ainsi le produit a été obtenu comme dans le cas précédent sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères non séparables par chromatographie avec un rendement de 58 %. Les spectres RMN montrent la présence des deux diastéréoisomères en proportion 1 : 1.

Les données spectroscopiques permettent la confirmation de ces structures (masse haute résolution : $[M+Na]^+ = 218,0641$). Ce mélange de diastéréoisomères présente un $[\alpha]_D^{25} = 20,3$ ($c = 1,05$; $CHCl_3$).

II.5.4. Synthèse du 1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2-ol 233

II.5.4.a. Schéma général

Le nitroalcool **216** a été préparé à partir du nitrodiol **212** selon le schéma réactionnel présenté ci-dessous :

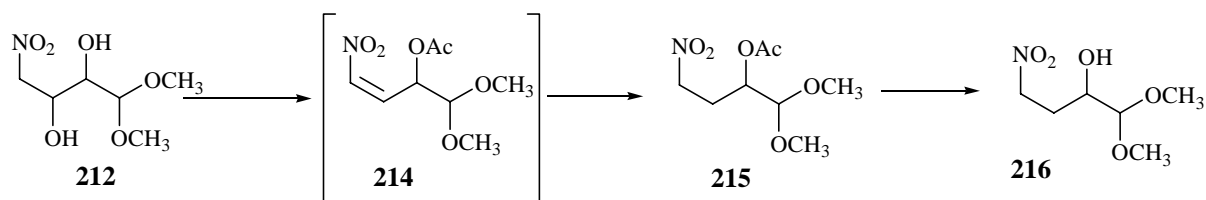


Schéma 80

Mettant à profit la réaction d'élimination spontanée en alpha du groupement nitro, une estérification de la fonction alcool permet d'obtenir l'alcène **214**. Ensuite la double liaison est réduite et l'alcool est déprotégé. Nous avons synthétisé les deux énantiomères *S*-**216** et *R*-**216** séparément à partir de (*2S*)-**212** et (*2R*)-**212**.

II.5.4.b. Elimination du groupement hydroxyle et réduction

Nous avons suivi une procédure décrite dans la littérature¹³⁶. Le traitement par l'anhydride acétique permet de réaliser l'élimination, ainsi que l'estérification de la fonction alcool en position β du groupement nitro. Les deux énantiomères *R*-**214** et *S*-**214** ont été utilisés sans purification dans l'étape suivante de réduction.

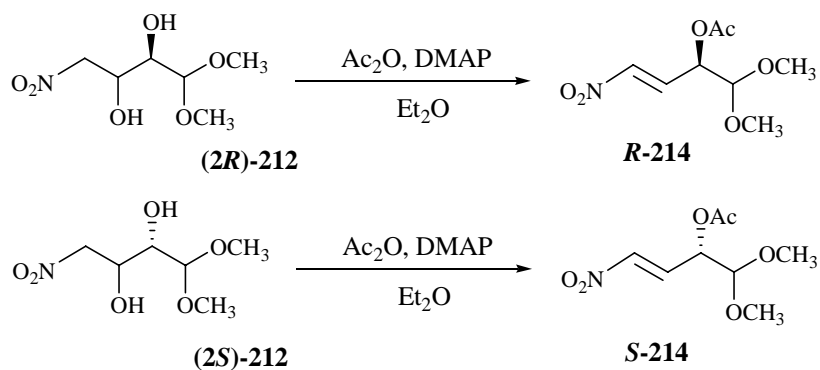


Schéma 81

Le milieu réactionnel est dilué par du méthanol et refroidit à 0°C avant l'addition de NaBH₄.

¹³⁶ Muratake, H. ; Natsume, M. ; Nakai, H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 11783.

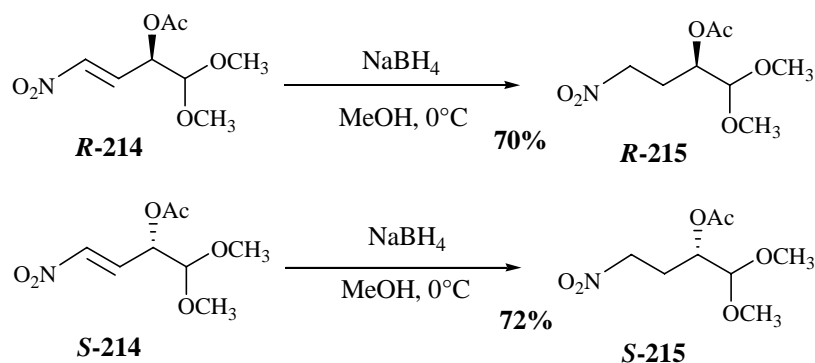


Schéma 82

Les deux esters **S-215** et **R-215** ont été obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice avec des rendements (calculés à partir de **212**) respectivement de 72% et 70% (**Schéma 82**).

Les spectres RMN des **(3S)-215** et **(3R)-215** montrent la présence de l'ester et deux signaux CH_2 . Ces structures ont été confirmées par les masses à haute résolution ($[\text{M}+\text{Na}]^+ = 244,0797$). **(3S)-215** et **(3R)-215** ont des pouvoirs rotatoires spécifiques respectivement de 16,5 (1,1 ; CHCl_3) et -15,5 (1,05 ; CHCl_3).

II.5.4.c. Hydrolyse de l'ester

La fonction ester a été hydrolysée en traitant les deux esters **(3S)-215** et **(3R)-215** en milieu basique dans le méthanol. Les β -nitroalcools **(3S)-216** et **(3R)-216** sont obtenus avec des rendements respectivement de 77% et 74%.

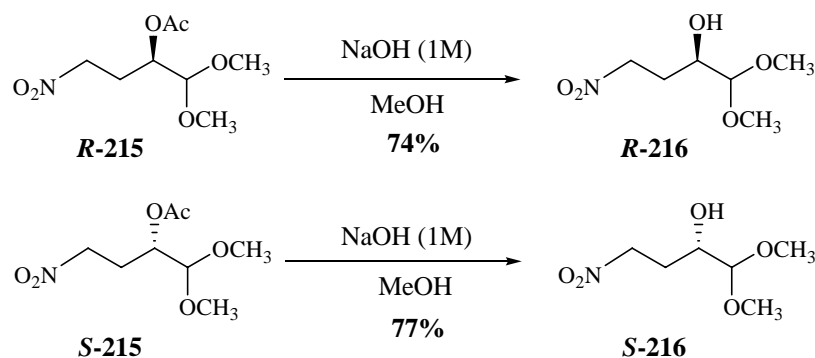


Schéma 83

Les données de la RMN montrent la disparition de l'ester et l'apparition de l'alcool. La masse à haute résolution a permis la confirmation de ces structures ($[\text{M}+\text{Na}]^+ = 202, 0701$).

II.6. Déprotection des aldéhydes

Nous avons mis au point les conditions d'hydrolyse du groupement acétal sur un composé racémique pris comme modèle. Nous avons donc choisi de réaliser la déprotection du **rac-209** en milieu aqueux, en présence de résine Dowex H^+ et en chauffant à 45°C . La réaction est suivie par CCM et l'aldéhyde correspondant n'est pas isolé.

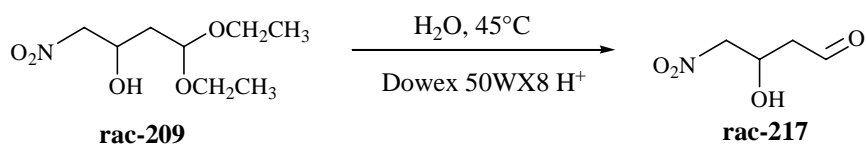


Schéma 84

Ainsi dans les mêmes conditions, les différents aldéhydes 4-nitro α et/ou β -hydroxylés ont été déprotégés (**Schéma 85**). Les réactions sont totales d'après la CCM et donnent un seul produit. Aucun des aldéhydes n'a été isolé, et ils ont tous été utilisés directement pour l'étape enzymatique avec l'aldolase après ajustement du pH.

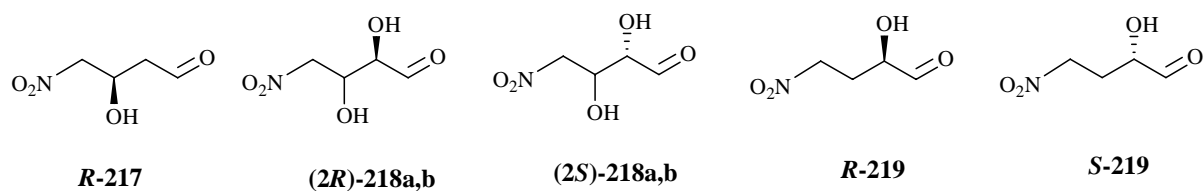


Schéma 85

III. Synthèse des nitrocyclitols

Nous venons donc de décrire la préparation de tous les aldéhydes nécessaires aux réactions de couplage avec le DHAP. Dans ce paragraphe, nous avons regroupé toutes les réactions catalysées par l'aldolase. Dans toutes les réactions de couplage, le DHAP est utilisé en léger défaut (0,8 éq).

Les réactions de condensation aldolique entre les différents nitroaldéhydes préparés et le DHAP synthétisé sont catalysées par l'aldolase du muscle de lapin (RAMA ou FBA) préalablement centrifugée. Elles ont été effectuées en milieu aqueux à pH 7,5 en utilisant 40 U de la FBA pour 1 mmol d'aldéhyde dissous dans 10 mL d'eau. Ensuite, le groupement phosphate est hydrolysé par action de la phytase à pH 3,9 (56 U). Lors de cette hydrolyse, la réaction de Henry intramoléculaire a lieu, permettant ainsi la formation des nitrocyclitols.

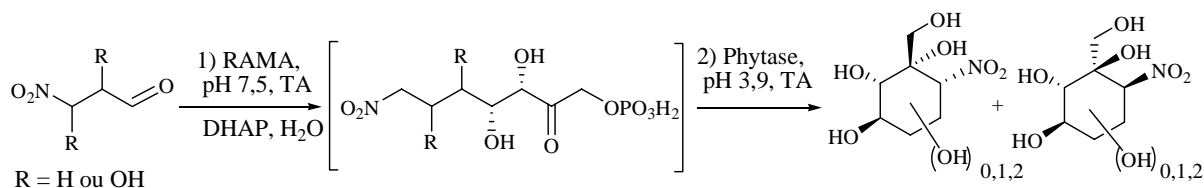
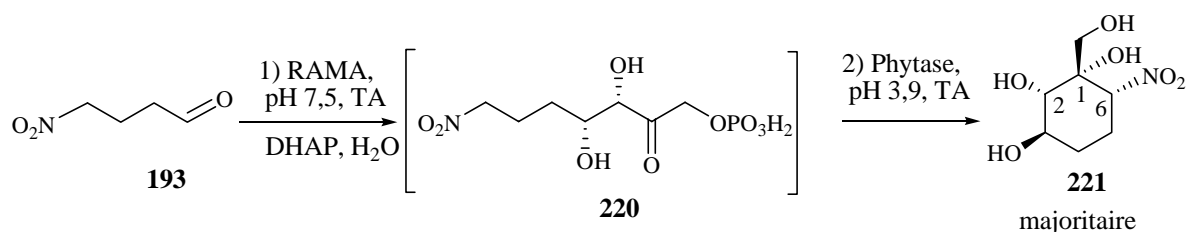


Schéma 86

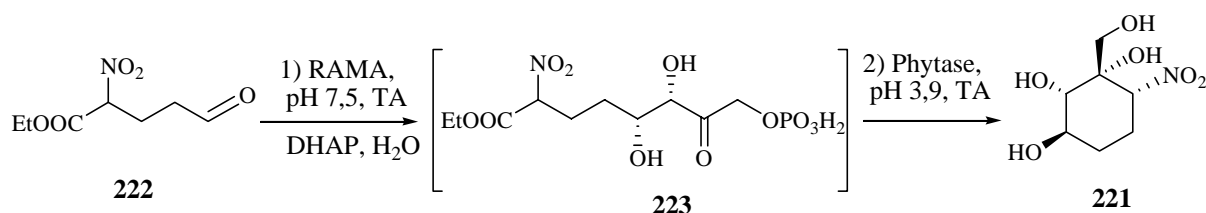
III.1. Préparation du trihydroxy hydroxymethyl nitrocyclitol 221

En raison de la faible solubilité du 4-nitrobutanal **193** dans l'eau, l'usage du DMSO (10 %) comme co-solvant a été nécessaire.

A partir du 4-nitrobutanal **193**, le nitrocyclitol **221** est majoritairement formé et purifié par chromatographie sur gel de silice. Il est obtenu avec un rendement de 69 %.



Les spectres de RMN correspondent à ceux du produit isolé par Dominique Crestia pendant sa thèse en partant de l'aldéhyde **222** présenté dans le schéma ci-dessous.¹⁰⁸



La structure et la stéréochimie avaient été confirmées par différentes analyses (NOEs (**Figure 36**), modélisation...) basées sur la stéréosélectivité « 3S, 4R » de l'aldolase.

Le tableau suivant présente les déplacements chimiques et les constantes de couplages du nitrocyclitol **221** :

Proton	H2	H3	H4eq	H4ax	H5 ax	H5eq	H6 ax	H7A	H7B
δ	3,37	3,75	2,01	1,35	2, 46	2,04	4,82	3,85	3,34
m	d	ddd	dddd	dddd	m	m	dd	d	d
J (Hz)	9,5 H3	9,5 H2 4,7 H4eq 11,2 H4ax	4,9 H5ax 12 H4ax 4,7 H3 3,1 H5eq	11,2 H3 12 H4eq 13,1 H5ax 4,4 H5eq			13 H5ax 4 H5eq	11,5 H7B	11,5 H7A

d : doublet, ddd : doublet dédoublé dédoublé, dddd : doublet dédoublé dédoublé dédoublé, m : multiplet

Tableau 7

D'après ces constantes de couplages, nous pouvons proposer les configurations et la conformation suivantes :

¹⁰⁸ Crestia, D. Thèse de l'université Blaise Pascal, n° 321, **2001**.

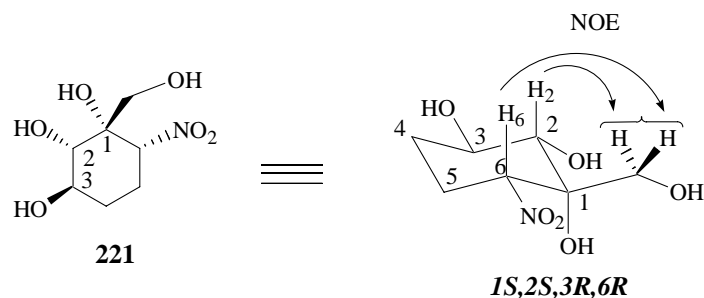


Figure 36

Grâce à cette réaction réalisée à partir de **193** au lieu de **222**, nous avons montré que pour préparer le produit **221**, la présence du groupement CO_2Et n'est pas indispensable. La labilité (acidité) de l'hydrogène en alpha du NO_2 seul est suffisante pour favoriser la réaction de Henry. Nous avons pu ainsi simplifier les voies d'accès à cette famille de nitrocyclitols. D'autant plus que d'après les études cinétiques réalisées pour les deux substrats vis-à-vis de l'aldolase (voir tableau en partie annexe), l'aldéhyde **193** est un meilleur substrat que l'aldéhyde **222**.

Pour expliquer la formation d'un produit cyclique, nous proposons le mécanisme suivant:

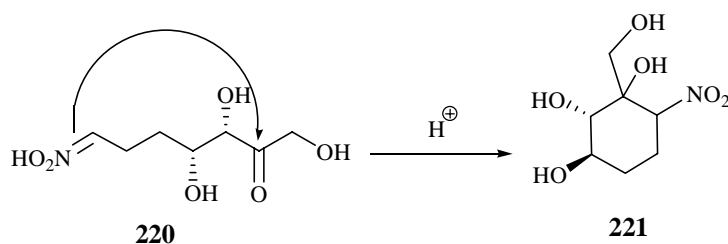


Schéma 89

Pour faire agir la phytase, il est nécessaire d'abaisser le pH à 3,9. En milieu acide nous favorisons la formation d'une entité nucléophile (forme *aci* du groupement nitro) qui peut ensuite réagir sur la fonction cétone. Il s'agit en fait d'une réaction de Henry intramoléculaire. Cette cyclisation est hautement stéréosélective puisqu'un stéréoisomère très largement majoritaire a été isolé.

Les spectres de RMN de **221** montrent la présence d'un autre isomère en petite quantité (6%). Les signaux de cet isomère sont en grande partie masqués par ceux de l'isomère majoritaire. Nous ne pouvons donc pas proposer de structure. Il sera nécessaire d'envisager un autre mode de purification que la chromatographie éclair, par exemple l'HPLC préparative ou semipréparative.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Tetrahedron: asymmetry* en 2004.¹³⁷

¹³⁷ El Blidi, L. ; Crestia, D. ; Gallienne, E. ; Demuynck, C. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2951.

III.2. Préparation des tétrahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols 226 et 227

L'aldéhyde **rac-217** est substrat de l'aldolase avec des V_m et K_m légèrement supérieurs à ceux de l'aldéhyde **193** (voir partie annexe). Ce qui signifie que la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 n'améliore pas les propriétés de ce type de substrat comme on aurait pu le supposer. Cette différence peut aussi s'expliquer par la formation de dimères ou autres formes hémiacétaliques à partir de l'aldéhyde **rac-217**. Cela aurait pour conséquence d'abaisser la concentration en aldéhyde libre et donc de modifier les paramètres cinétiques.

Selon la même stratégie, que précédemment le couplage entre l'aldéhyde **rac-217** et le DHAP a permis l'isolement des deux nitrocyclitols **226** et **227** dans les proportions 45/55, séparables par chromatographie sur gel de silice avec un rendement global de 64 %. La différence de proportionnalité peut être expliquée par une légère énantiopréférence de l'aldolase en faveur de l'énantiomère **S-217** et le fait de travailler avec un petit défaut en DHAP (0,8 éq) permet de la mettre en évidence. Cette énantiopréférence a été observée sur un aldéhyde possédant un centre asymétrique en position β portant un groupement N_3 (**Schéma 44**).¹¹¹ Les produits de couplage ont été obtenus dans les proportions (2/1), avec le stéréoisomère majoritaire dérivant de l'aldéhyde $\beta(S)$. Les auteurs ne donnent pas d'explications pour cette énantiopréférence de l'aldolase vis-à-vis de la position β de l'aldéhyde.

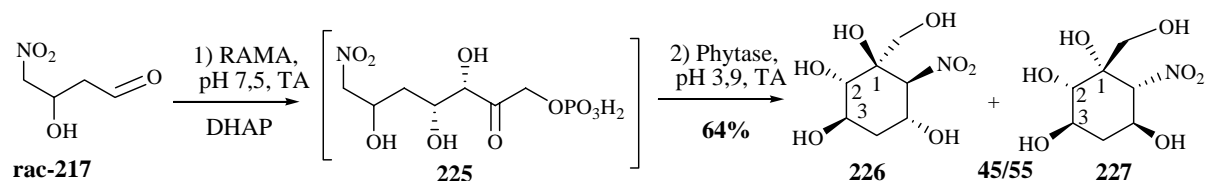
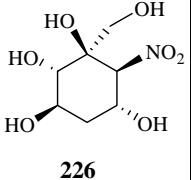


Schéma 90

Analyses de RMN 1H des produits **226** et **227**

Proton		H2	H3	H4eq	H4ax	H5	H6	H7A	H7B
 226	δ	3,96	4,03	2,15	1,98	4,67	4,63	3,77	3,42
	m	d	ddd	ddd	ddd	ddd	d	d	d
	J(Hz)	3 H3	3 H2 3 H4ax 3 H4eq	4 H5 13 H4ax 3 H3	3 H3 13 H4eq 11 H5	4 H4eq 11 H6 11 H4ax	11 H5	11,5 H7B	11,5 H7A
 227	δ	3,4	3,80	2,27	1,43	4,50	4,65	3,87	3,25
	m	d	ddd	ddd	ddd	ddd	d	d	d
	J (Hz)	9,3 H3	9,3 H2 12 H4ax 4,7 H4eq	5,1 H5 12 H4ax 4,7 H3	12 H3 12 H4eq 12,2 H5	5,1 H4eq 10,2 H6 12,2 H4ax	10,2 H5	11 H7B	11 H7A

d : doublet, ddd : doublet dédoublé dédoublé, m : multiplet

Tableau 8

¹¹¹ Mitchell, M. L. ; Lee, L. V. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5691.

En se basant sur la stéréosélectivité de l'aldolase qui induit la configuration *S* sur le carbone 2 et les données RMN (effets NOEs et constantes de couplage) Les configurations absolues de **226** et **227** ont été déterminées.

Pour le nitrocyclitol **226**, et d'après les constantes de couplage mesurées par la RMN du ^1H (**Tableau 8**), nous pouvons proposer les configurations et la conformation suivantes :

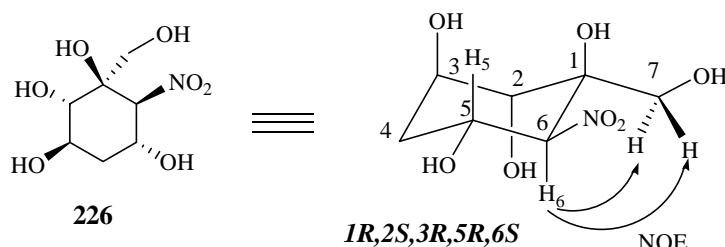


Figure 37

La constante de couplage entre les protons H_2 et H_3 est de l'ordre de 3 Hz, donc ils sont en position équatoriale, tandis que pour H_5 et H_6 on mesure 11 Hz, ceux-ci sont axiaux.

Concernant les configurations absolues, deux sont fixées par l'aldolase : *2S* et *3R*. Une expérience NOESY a montré la présence d'effets NOEs entre le proton H_6 et les deux protons H_7 , cela montre que le $-\text{CH}_2\text{OH}$ est en position équatoriale. Donc, nous pouvons proposer les configurations suivantes : *1R,2S,3R,5R,6S*.

Pour le nitrocyclitol **227**, et d'après les constantes de couplage mesurées par RMN du ^1H (**Tableau 8**), nous pouvons proposer les configurations et la conformation suivantes :

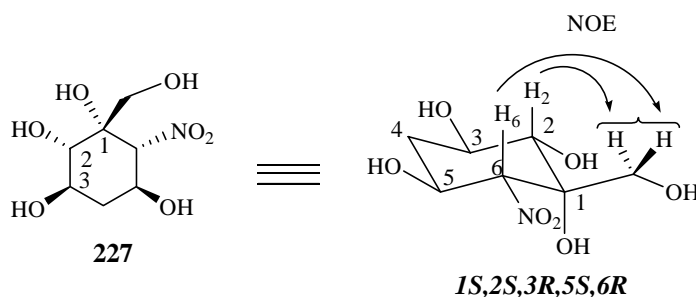


Figure 38

Pour les protons H_2 et H_3 puis H_5 et H_6 de grandes constantes de couplage ont été mesurées. Ils sont donc tous les quatre en position axiale. Une expérience NOESY a montré la présence d'effets NOEs entre les protons H_6 , H_2 et les protons H_7 . Le groupe $-\text{CH}_2\text{OH}$ est en position équatoriale. Nous pouvons en déduire les configurations suivantes : *1S,2S,3R,5S,6R*.

Nous avons constaté que les configurations des carbones en position 1 et 6 ont été dépendantes de celle du carbone asymétrique de l'aldéhyde **217**. Si la configuration est *R* on obtient le nitrocyclitol **226** et si la configuration est *S* c'est le nitrocyclitol **227** qui est formé.

En étant à température ambiante dans l'eau et en ayant laissé le milieu réactionnel plusieurs heures dans ces conditions, nous pensons être sous contrôle thermodynamique. Ainsi, dans chaque cas, c'est sans doute le composé thermodynamiquement le plus stable que

nous avons formé. Pour **227**, tous les substituants du cyclohexane sont équatoriaux et pour **226**, ceux dépendants de la réaction de Henry sont aussi équatoriaux.

Si jamais la réaction est sous contrôle cinétique, nous proposons l'explication suivante pour commenter nos résultats. Ces conformations et configurations absolues pourraient être liées aux états de transitions suivants :

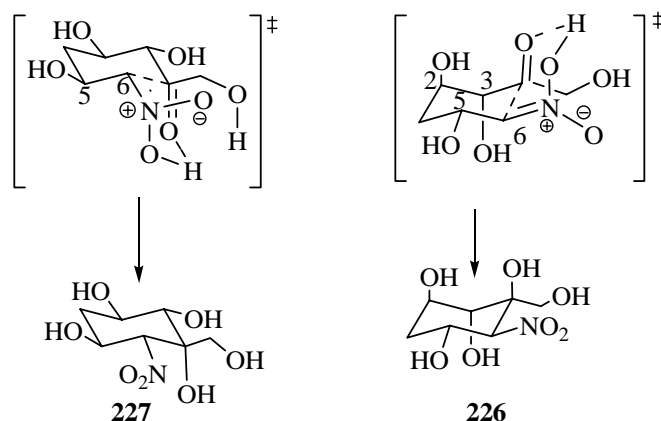


Schéma 91

Il pourrait se créer des liaisons hydrogènes entre la forme *aci*-nitro et le carbonyle, donnant ainsi une allure de *cis* décaline à l'état de transition (deux formes chaises accolées). Dans le cas de **226**, on voit alors que pour obtenir cela, il faut que les groupements hydroxyles en 2 et 3 soient envoyés en position axiale. Et dans les deux cas, l'hydroxyle en position 5 est toujours en position équatoriale.

Il est important de noter que ces deux cyclitols sont les deux seuls stéréoisomères isolés, ainsi la réaction de Henry est hautement stéréosélective quand il y a cet OH en position 5.

Nous avons profité de cette propriété de la réaction de Henry pour réaliser la corrélation chimique de **217** obtenu après dédoublement cinétique enzymatique. Le couplage entre le DHAP et l'aldéhyde **R-217** a bien donné le nitrocyclitol **226** avec un rendement de 50%. Le modèle prédictif de Kazlauskas était bien adapté à notre cas, la lipase a bien transestérifié l'alcool de configuration *S* plus rapidement.¹²³

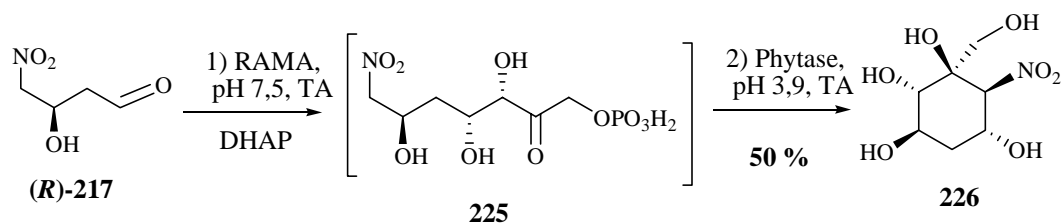


Schéma 92

Par la même occasion, nous avons montré qu'il est possible de préparer l'un des deux nitrocyclitols sans l'étape de séparation d'avec l'autre stéréoisomère.

¹²³ Bornscheuer, U.T.; Kaslauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis*, 1999, VCH: Weinheim.

III.3. Préparation des pentahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols **228** et **229**

Les constantes cinétiques V_m et K_m des aldéhydes **(2S)-218 a, b**, **(2R)-218 a et b** par rapport à l'aldolase sont impossibles à déterminer à cause de la couleur orange que prend la solution contenant les aldéhydes. Cela masque le dosage du DHAP par l'intensité d'absorbance qui trop élevée dès le départ. Nous avons donc réalisé leur couplage avec le DHAP sans étude cinétique préalable.

La condensation du DHAP sur les aldéhydes **(2S)-218 a et b** (mélange des deux diastéréoisomères) a permis l'isolement de deux nitrocyclitols **228** et **229** séparables par chromatographie. Ils ont été obtenus avec un rendement de 41% et dans les proportions 1 : 1,5. De façon attendue, deux cyclitols ont été formés, dépendants de la stéréochimie de l'acool en C3.

Comme le cas décrit dans la littérature,¹¹¹ l'aldolase a montré une énantiopréférence en faveur de l'aldéhyde **(2S,3S)-218**.

Pour commenter la proportion légèrement en faveur de **229**, deux explications sont possibles. Soit la réaction est sous contrôle cinétique et dans ce cas, il y a un dédoublement partiel de l'aldéhyde en raison du défaut de DHAP. Soit la réaction est sous contrôle thermodynamique, donnant un intermédiaire cyclique hémiacétalique (furanose ou pyranose ?) plus stable que l'autre du fait de la différence de stéréochimie en C3.

Nous n'avons pas connaissance qu'une étude cinétique liée à la présence d'un carbone asymétrique en C3, ait jamais été réalisée avec l'aldolase.

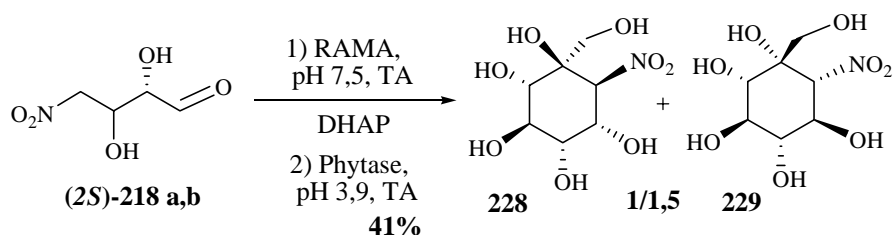


Schéma 93

Les données de la RMN notamment les constantes de couplage (et en se basant toujours sur la stéréosélectivité de l'aldolase), ont permis la détermination des différentes configurations. Pour le nitrocyclitol **228**, les protons H_2 et H_3 sont en position équatoriale car ils donnent une petite constante de couplage (4 Hz), tandis que H_5 et H_6 sont axiaux avec une grande constante de couplage de 10 Hz. H_4 est équatorial car il donne avec H_5 une petite constante de couplage (3,5 Hz). Nous pouvons donc proposer les configurations et la conformation suivantes :

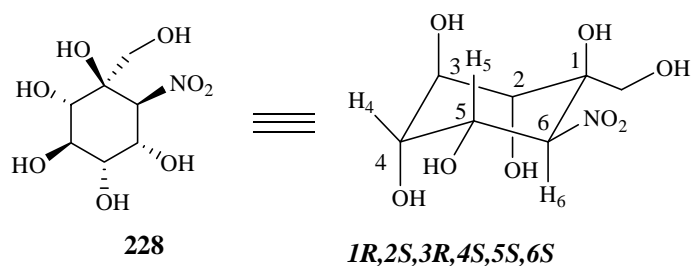


Figure 39

¹¹¹ Mitchell, M. L. ; Lee, L. V. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5691.

Nota : en raison de la présence d'un hydroxyle en 4, les priorités pour C5 changent.

Concernant le nitrocyclitol **229**, pour les protons H₂ et H₃ d'une part et H₅ et H₆ d'autre part, une grande constante de couplage a été mesurée (10 Hz), nous indiquant qu'ils sont axiaux. Entre H₅ et H₄ nous avons mesuré 12 Hz correspondant à un couplage axial-axial, donc H₄ est lui aussi en axial. La stéréochimie et la conformation la plus stable qui correspondent à ces données sont les suivantes :

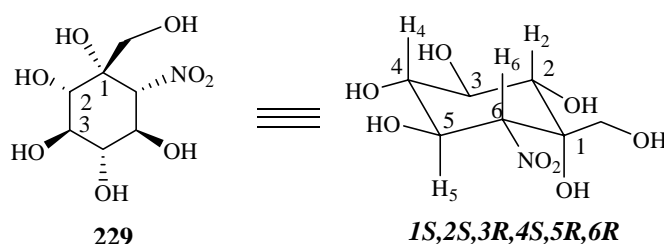


Figure 40

Dans ce cas aussi, la stéréochimie de la nitrocyclisation est gouvernée par celle du carbone en position trois de l'aldéhyde. Avec la configuration *S* on obtient le nitrocyclitol **229**, en revanche la configuration *R* donne le nitrocyclitol **227**. La proposition des états de transition type *cis* décaline est aussi plausible dans ce cas.

III.4. Préparation des pentahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols **230** et **231**

Selon la même stratégie, les diastéréoisomères (**2R**)-**218 a** et **b** ont été couplés avec le DHAP pour donner les deux nitrocyclitols **230** et **231** attendus, séparables par chromatographie avec un rendement de 49 % dans les proportions de 1 : 2. Les aldéhydes possédant un centre asymétrique en position β, l'aldolase a montré à nouveau son énantio-préférence en faveur de l'aldéhyde β(*S*).

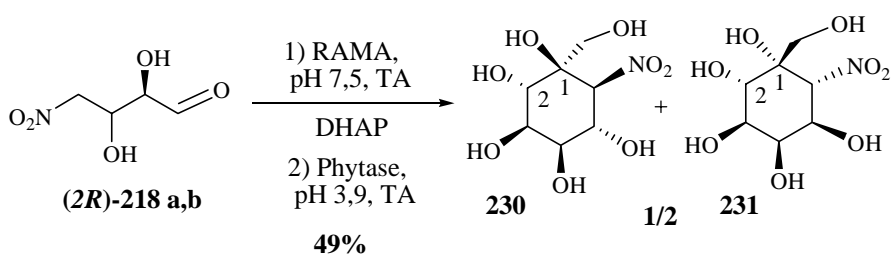


Schéma 94

Pour la différence de proportion, les mêmes remarques que dans le cas de **228** et **229** sont proposées.

Comme précédemment, les données RMN ont permis de déterminer la stéréochimie de ces nitrocyclitols.

Pour le nitrocyclitol **230**, H₂ et H₃ sont équatoriaux car ils donnent une petite constante de couplage (4 Hz), tandis que H₅ et H₆ sont axiaux avec une grande constante de couplage de 10 Hz. H₄ est axial car il donne avec H₅ une grande constante de couplage (10 Hz).

D'après ces mesures, les configurations et le conformère le plus stable de **230** sont les suivants :

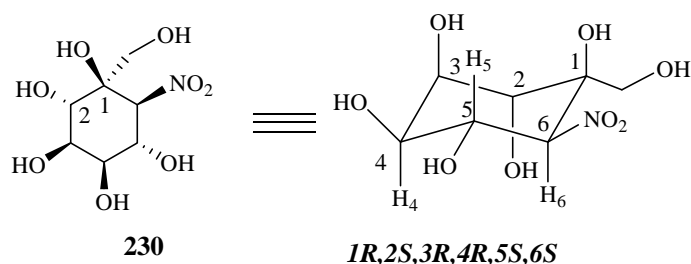


Figure 41

Concernant le nitrocyclitol **231** nous avons déterminé que les protons H₂ et H₃ sont axiaux car ils donnent une grande constante de couplage (10 Hz). H₅ et H₆ sont aussi axiaux car 11 Hz a été mesuré comme constante de couplage. H₄ est équatorial car il donne avec H₅ une petite constante de couplage (3 Hz). Donc les configurations et le conformère le plus stable correspondant à ces données sont les suivants :

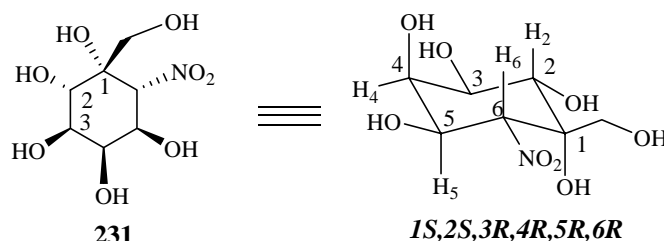


Figure 42

III.5. Préparation des tétrahydroxy hydroxymethyl nitrocyclitols **232** et **233**

Les deux énantiomères **S-219** et **R-219** ont été aussi couplés de façon indépendante avec le DHAP selon la même stratégie. En l'absence d'un centre asymétrique en position 3 sur le nitroaldéhyde, un seul nitrocyclitol est majoritairement isolé pour chaque aldéhyde (**Schéma 95**).

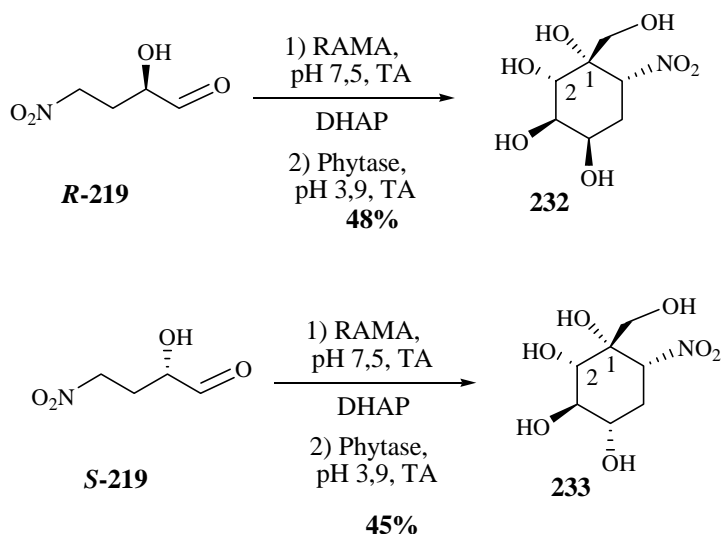


Schéma 95

Les constantes de couplage de RMN des produits **232** et **233** montrent que les protons H₂ et H₃ sont axiaux car ils donnent de grandes constantes de couplages (10 Hz), H_{5ax} et H₆ sont aussi axiaux car ils donnent 13 Hz comme constante de couplage. Pour le nitrocyclitol **232** le proton H₄ est équatorial car il donne avec H₃ une petite constante de couplage (3 Hz). Pour le nitrocyclitol **233**, c'est la situation inverse, une grande constante de couplage est mesurée entre H₃ et H₄. Donc les configurations et le conformère le plus stable pour chaque molécule correspondant à ces données sont les suivants :

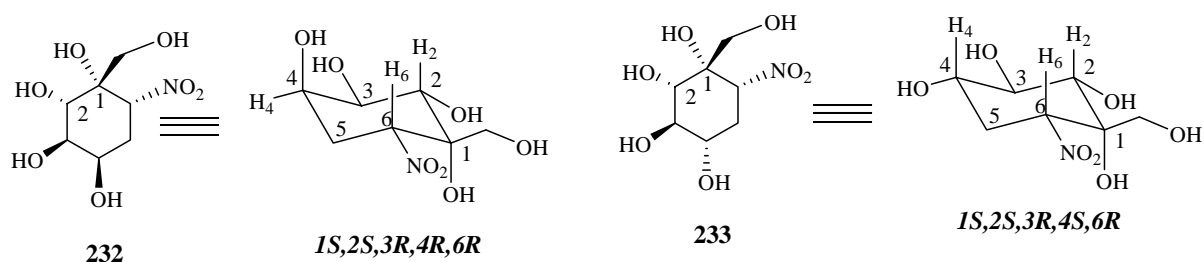


Schéma 96

Comme pour le nitrocyclitol **221**, les spectres de RMN des nitrocyclitols **232** et **233** montrent la présence d'un autre isomère en très faible quantité. Dans les deux cas, les isomères ne sont pas séparables par chromatographie éclair.

En revanche, pour l'un des deux cyclitols (**232**), nous avons pu observer des signaux bien distincts par RMN, à côté de ceux de l'isomère majoritaire, qui correspondent à l'isomère minoritaire. Nous avons ainsi cherché à déterminer sa structure en nous basant sur les constantes de couplage. H_{5ax} a donné deux grandes constantes de couplages axial-axial, ce qui indique que H₆ et H₄ sont axiaux. H₃ a donné des petites constantes de couplages confirmant sa position équatoriale. Nous proposons, donc pour l'isomère minoritaire la structure et les configurations suivantes :

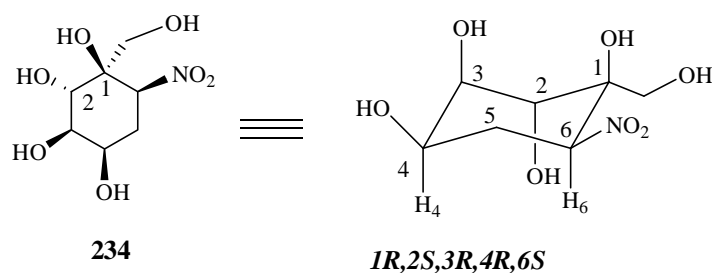


Figure 43

Il s'agit du stéréoisomère **1R,6S** déjà observé précédemment dans les cas où un hydroxyle est présent en alpha du NO₂. Ce n'est donc pas surprenant.

Par extrapolation, nous pensons que les isomères très minoritaires observés avec **221** et **233** sont sans doute aussi de stéréochimie **1R,6S**. L'absence du groupement hydroxyle en position alpha des NO₂ rend la réaction légèrement moins diastéréosélective.

Avec ce résultat, nous pensons aussi qu'il s'agit bien de la réaction de Henry qui favorise la formation de ce stéréoisomère minoritaire et non pas l'aldolase qui serait moins stéréosélective. La stéréochimie **3S,4S** au lieu de **3S,4R** habituelle n'est pas plausible en raison de la position équatoriale de H₃.

IV. Synthèse des aminocyclitols

IV.1. Aminocyclitols par réduction du groupement nitro

Nous avons réduit le groupement nitro sous pression d'hydrogène (50 psi) en présence de PtO_2 dans un mélange MeOH/AcOH (95/5) à l'aide d'un appareil de Parr. Le détail de cette réduction est présenté pour la préparation de l'aminocyclitol **235**. Nous avons obtenu un rendement de 80 %.

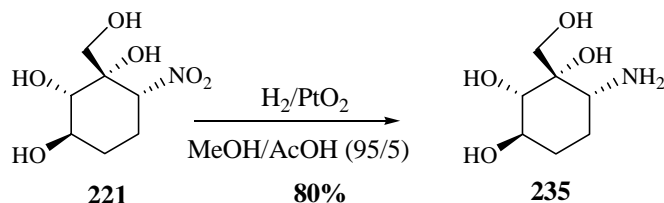


Schéma 97

Dans les mêmes conditions, les autres nitrocyclitols **226** à **233** ont été réduits en aminocyclitols correspondants **236** à **243** avec des rendements compris entre 60% et 80%.

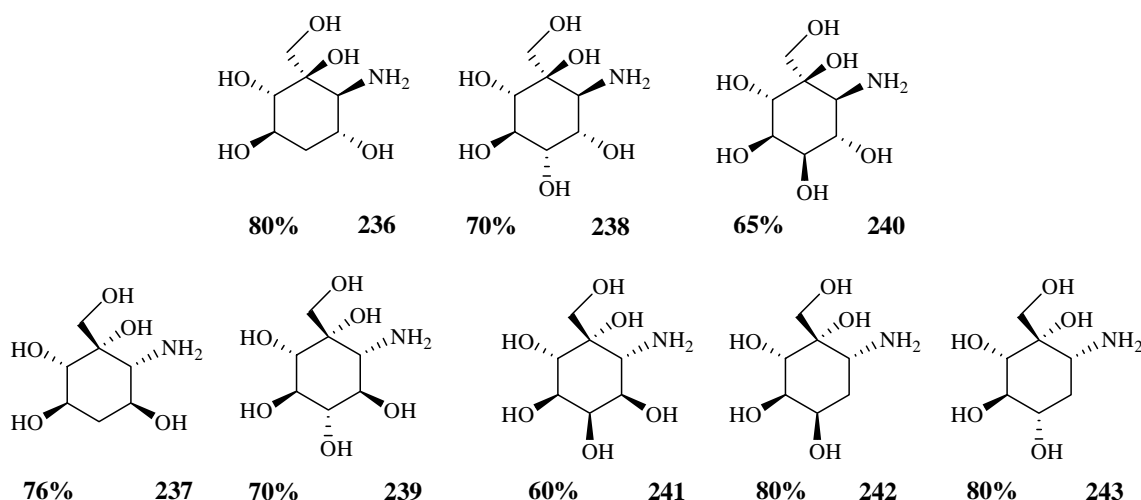


Figure 44

Ces aminocyclitols ont été purifiés sur résine échangeuse de cation (H^+) éluée à l'ammoniaque 1 M. Les spectres de RMN du ^{13}C obtenus pour ces aminocyclitols montrent la disparition du signal correspondant au carbone portant le groupement nitro (85 à 95 ppm) et l'apparition d'un signal (50 à 60 ppm) correspondant au carbone portant l'amine.

Les nitrocyclitols **221**, **226** et **227** et les aminocyclitols **235**, **236** et **237** correspondants associés à leurs propriétés inhibitrices ont fait l'objet de deux articles publiés dans la revue *Tetrahedron: Asymmetry* en 2004 et 2006.^{135,137}

¹³⁵ El Blidi, L. ; Ahbala, M. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *Tetrahedron: asymmetry* **2006**, sous presse.

¹³⁷ El Blidi, L. ; Crestia, D. ; Gallienne, E. ; Demuyne, C. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2951.

IV.2. Synthèse des zwitterions

Avec l'objectif d'obtenir de nouveaux analogues du salacinol **6** (Figure 19) potentiellement inhibiteurs de glycosidases, nous avons couplé les aminocyclitols **235** et **237** avec le sulfate cyclique **244** (Schéma 98).

Les sels zwitterioniques possèdent une charge positive permanente stabilisée par un sulfate. La synthèse de ce sulfate cyclique **244** avait été réalisée dans notre équipe par Estelle Gallienne au cours de sa thèse.¹³⁸ Ces réactions de couplage ont été effectuées dans le 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) en présence de carbonate de sodium anhydre permettant de tamponner le milieu. Elles ont permis l'obtention des deux zwitterions **245** et **246** avec des rendements respectifs de 69% et 54%.

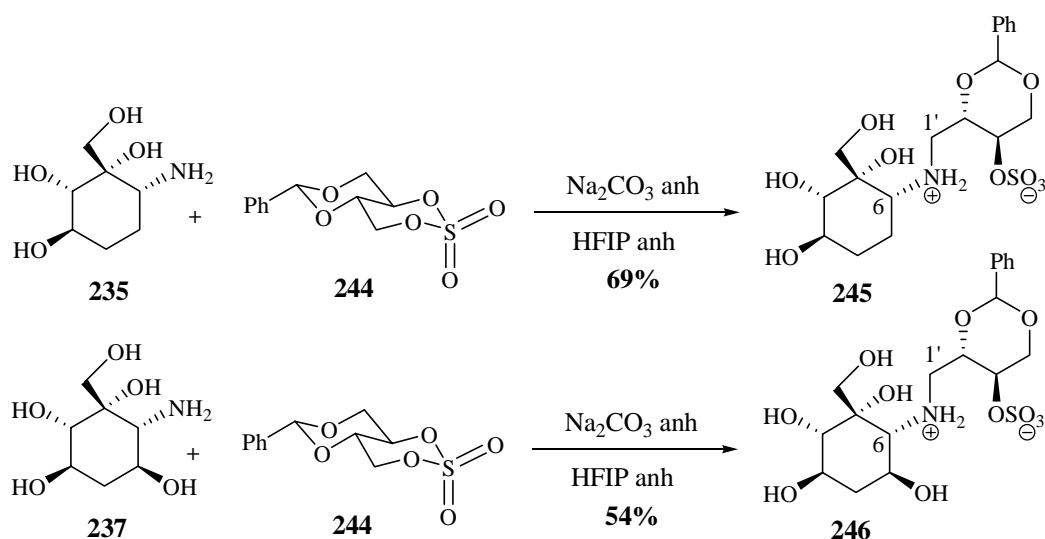


Schéma 98

Les données de la RMN des deux produits avant le couplage et celles des composés zwitterioniques obtenus montrent que la réaction a bien eu lieu. En effet, on observe un déblindage des carbones C₆ (61 ppm par rapport à 57 ppm pour l'amine **235** et 67 ppm par rapport à 54 ppm pour l'amine **235**), mais surtout un blindage des protons des protons H_{1'} (3,2 et 3,7 ppm pour les zwitterions **245** et **246** respectivement par rapport à 4,6 pour le sulfate cyclique) et des carbones C_{1'} (50 et 45 ppm par rapport à 60 ppm pour le sulfate cyclique), attestant l'ouverture du sulfate cyclique par l'atome d'azote.

Les zwitterions ont ensuite été déprotégés par hydrogénolyse dans un mélange : acide acétique/eau (4/1). Les composés **247** et **248** ont ainsi été isolés avec des rendements respectifs de 61% et 56%.

¹³⁸ Gallienne, E. Thèse de l'université Blaise Pascal, n° 1560, 2005.

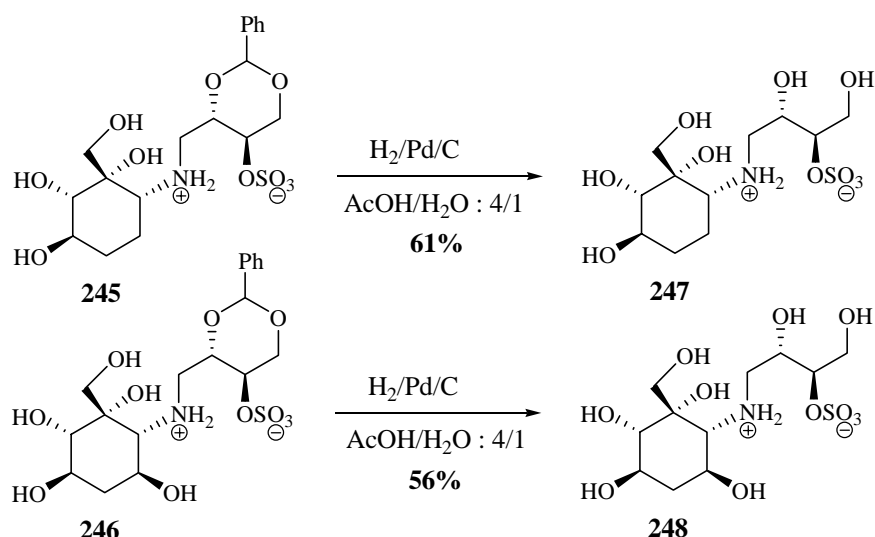


Schéma 99

Les spectres de RMN de ces zwitterions montrent la disparition de groupement benzylidène et l'apparition des hydroxyles.

IV.3. Synthèse d'un aminocyclitol alkylé

Avec l'objectif de préparer des aminocyclitols alkylés, analogues du voglibose et de comparer leurs activités inhibitrices avec celles des aminocyclitols non alkylés, nous avons envisagé d'hydrolyser le groupement sulfate des composés précédents. Pour des raisons de temps, nous n'avons réalisé qu'un seul essai. Celui-ci a concerné le zwitterion **247**. La désulfatation a été réalisée en milieu fortement acide dans le dioxane. Le produit **249** est isolé avec un rendement de 89%.

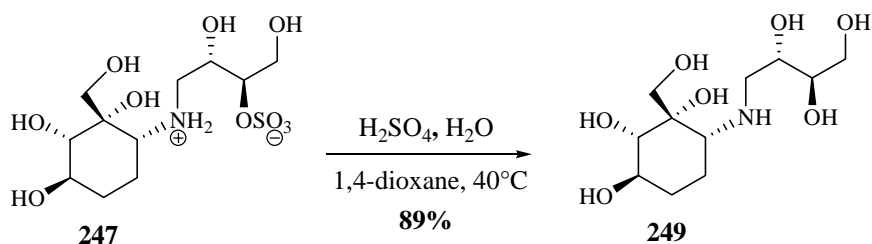


Schéma 100

Les données de la RMN du composé **249** ne sont pas suffisantes pour complètement identifier sa structure. Après hydrolyse du sulfate tous les carbones et les protons ont presque gardés les mêmes valeurs de déplacements chimiques. La structure a été établie définitivement par spectrométrie de masse haute résolution ($[M+H]^+ = 282,1550$).

V. Evaluation des propriétés inhibitrices

V.1. Brefs rappels de cinétique enzymatique

Une réaction enzymatique peut être décrite par différents modèles. En 1913, Leonor Michaelis et Maud Menten ont proposé un modèle simple, dans lequel l'enzyme (E) en présence du substrat (S) forme un complexe dissociable (ES), qui libère le produit de la réaction (P) (**Schéma 101**).

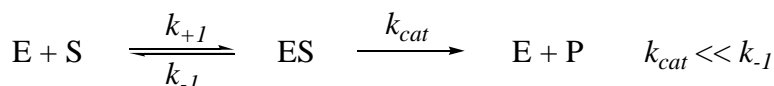


Schéma 101

La vitesse d'apparition du produit v est également constante : $v = k_{cat} \times [ES]$

En posant $K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}} = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$, avec K_m appelée constante de Michaelis, et $[E]_t = [E] + [ES]$, avec $[E]_t$ la concentration totale en enzyme, on obtient l'équation de Michaelis-Menten (**Équation 3**).

$$v = k_{cat} \times [E]_t \frac{[S]}{[S] + K_m} = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Équation 3

Les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique v_{max} et K_m sont définis de la façon suivante :

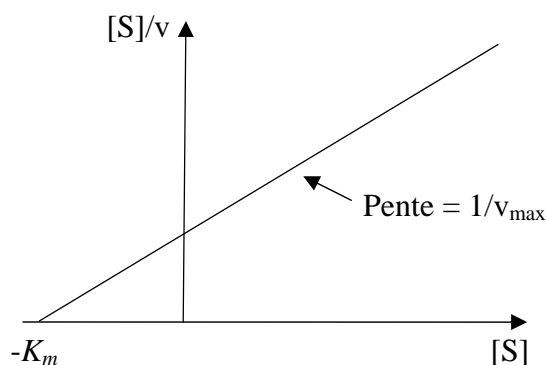
- v_{max} représente la vitesse maximale de la réaction. Elle est atteinte pour une concentration élevée en substrat et traduit la saturation de l'enzyme par le substrat, c'est-à-dire lorsque l'enzyme est entièrement sous forme de complexe (ES).
- K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de v_{max} ou pour laquelle la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée. Ainsi plus le K_m est faible et plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est importante.

Ces paramètres cinétiques peuvent facilement être déterminés en portant sur un graphique les valeurs de $[S]/v$ obtenues pour différentes concentrations en substrat $[S]$. En effet, on peut transformer l'équation de Michaelis-Menten (**Équation 3**) en l'équation suivante :

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}}$$

Équation 4

Le tracé de $[S]/v$ en fonction de $[S]$, appelé représentation de Hanes-Woolf, donne une droite, qui coupe l'axe des abscisses en $-K_m$ et dont la pente est $1/v_{max}$



V.2. Inhibition compétitive

La synthèse d'inhibiteurs d'enzymes consiste le plus souvent à mimer le substrat naturel de l'enzyme ou l'état de transition de la réaction enzymatique. Ainsi les inhibiteurs obtenus, analogues structuraux du substrat, sont en général de type compétitif. Il apparaît donc une compétition entre le substrat (S) et l'inhibiteur (I) pour l'occupation du site actif de l'enzyme (E) et il y a formation de complexes dissociables (ES) et (EI). L'existence du complexe (EI) diminue la quantité d'enzyme libre et ralentit fortement la réaction de formation du produit (P) (**Schéma 102**).

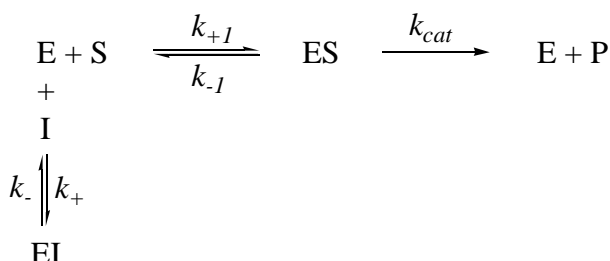


Schéma 102

Avec $K_m = \frac{[\text{E}] \times [\text{S}]}{[\text{ES}]}$, $K_i = \frac{k_{-}}{k_{+}} = \frac{[\text{E}] \times [\text{I}]}{[\text{EI}]}$ et $[\text{E}]_t = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}]$, on peut alors définir la vitesse de la réaction en présence d'inhibiteur (**Équation 5**).

$$v_i = v_{\max} \frac{[\text{S}]}{[\text{S}] + K_m \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i} \right)} = v_{\max} \frac{[\text{S}]}{[\text{S}] + K'_m}$$

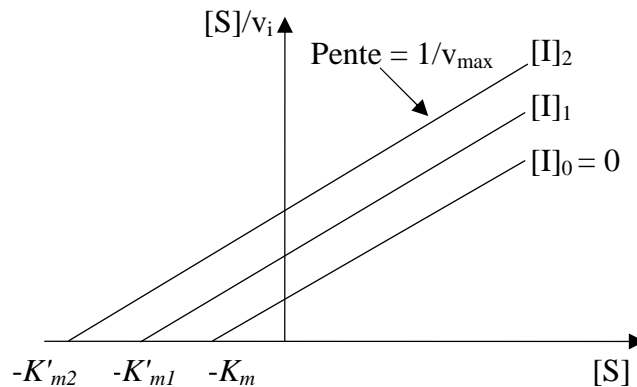
Équation 5

K'_m est la constante de Michaelis apparente. Elle augmente avec la concentration en inhibiteur. Par contre, la vitesse maximale v_{\max} est inchangée en présence d'un inhibiteur compétitif. K_i est la constante d'inhibition, qui définit l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. Plus la valeur de cette constante est faible et plus l'inhibiteur est efficace.

Pour déterminer ces paramètres cinétiques, on peut transformer, de la même façon que précédemment, l'équation donnant la vitesse de la réaction **Équation 4** en :

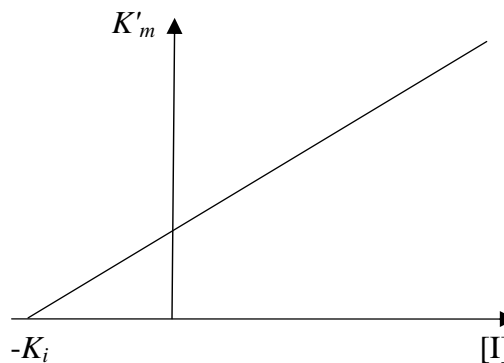
$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K'_m}{v_{\max}}$$

La représentation de Hanes-Woolf pour différentes concentrations en inhibiteur donne plusieurs droites parallèles, qui permettent d'obtenir les différents K'_m (**Graphique 2**). L'obtention de droites parallèles permet d'affirmer que l'inhibition observée est compétitive.



Graphique 2

Si l'on considère l'équation $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ et que l'on reporte les valeurs de K'_m obtenues en fonction de la concentration en inhibiteur $[I]$, on obtient également une droite, qui coupe l'axe des abscisses en $-K_i$ (**Graphique 3**).



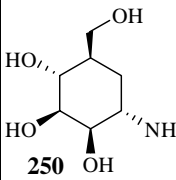
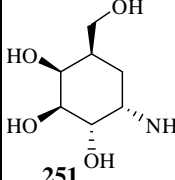
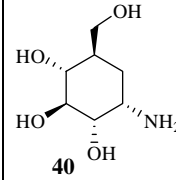
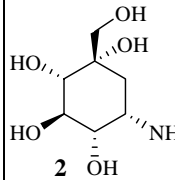
Graphique 3

Il existe d'autres types d'inhibition comme l'inhibition anti-compétitive et l'inhibition non compétitive (voir annexe).

V.3. Données de la littérature

Les propriétés biologiques des aminocyclitols synthétisés seront comparées dans la mesure du raisonnable avec celles tirées de la littérature pour la validamine et la valioline. La valioline est bien commerciale, mais malheureusement nous n'avons pas pu en obtenir et par manque de temps nous n'avons pas réalisé sa synthèse totale par ailleurs assez

fastidieuse. Malgré tout, nous ne pourrions donc pas directement comparer selon nos propres conditions d'analyse. Nous avons choisi quelques tests biologiques de la validamine réalisés sur quelques glycosidases commerciales qui se rapprochent le plus des nôtres.^{28,52,56,60,79}

inhibiteur	IC ₅₀ en μ M			
				
α -glucosidase (levure de boulanger)	NT	NT	580	190
β -glucosidase (amandes)	NT	NT	1500	8100
α -galactosidase (grains de café vert)	NI	500	NI	NT
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	NI	210 [#]	NI	NT
α -mannosidase (pois sabre)	56	NI	NI	NT

NI : non inhibiteur ; NT : non testé ; [#] : *Aspergillus niger*.

Tableau 9

Par analogie avec la stéréochimie des substrats naturels, on retrouve une certaine spécificité de l'inhibition par ces différents produits. La manno-validamine **250** est un inhibiteur de l' α -mannosidase, la galacto-validamine **251** est active sur les galactosidases alors que la validamine **40** n'inhibe pas ces enzymes. La validamine et la valioline **2** sont logiquement actives surtout sur l' α -glucosidase.

Ces dérivés ci-dessous, parmi les plus proches de nos molécules, n'ont pas montré d'inhibition notable sur les mêmes familles d'enzymes.^{52,60}

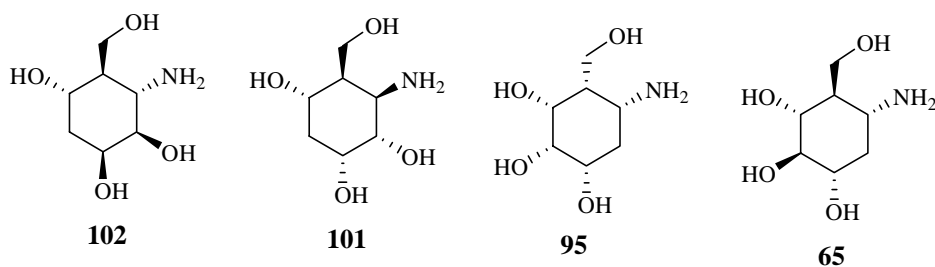


Figure 45

²⁸ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Takeuchi, M. ; Yamaguchi, T. ; Katsuhiko, M. *J. Antibiot.* **1984**, 37, 1301.

⁵² Gravier-Pelletier, C. ; Maton, W. ; Dintiger, T. ; Tellier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8705-8720.

⁵⁶ Sureshan, K. M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Watanabe, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 8367.

⁶⁰ Mehta, G. ; Lakshminath, S. ; Talukdar, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 335-338.

⁷⁹ Kameda, Y. ; Kawashima, K. ; Takeuchi, M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Matsui, K. *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 259.

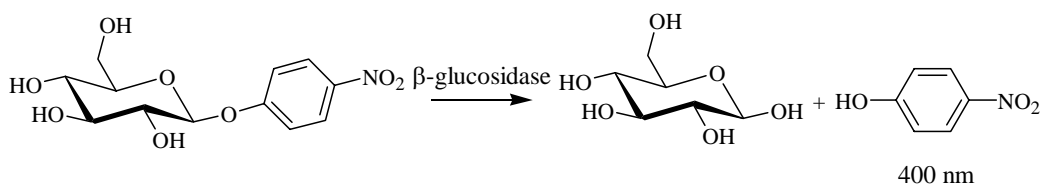
V.4. Détermination des constantes de Michaelis

Comme nos aminocyclitols présentent un ensemble de stéréochimies différentes apportées soit par dédoublement enzymatique, soit par l'aldolase et par la réaction de Henry intramoléculaire ainsi qu'un nombre variable de groupements hydroxyles, nous les avons testé sur plusieurs glycosidases communes commerciales. La fonction amine de ces aminocyclitols est en position alpha par rapport au groupement CH₂OH, ce qui les différencie nettement des inhibiteurs décrits comme la valioline et ses analogues naturels. Il a déjà été montré dans la littérature que ce type d'aminocyclitols ne représente pas une super famille d'inhibiteur.^{52,60} Les différences existantes entre nos aminocyclitols laissent quand même envisager une certaine sélectivité vis-à-vis des glycosidases.

Nous avons travaillé avec les glycosidases commerciales suivantes : l' α -glucosidase de levure de boulanger, la β -glucosidase d'amandes, l' α -galactosidase de grains de café vert, la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* et l' α -mannosidase de pois sabre. Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate 25 mM à pH 6,8 et à 25°C.

Les fournisseurs de ces enzymes ne définissent pas forcément leurs activités par rapport aux nitrophénylglycopyranosides correspondants. Ainsi, l'activité de la β -glucosidase est définie par rapport au 2-(hydroxyméthyl)phényl- β -D-glucopyranoside, mais elle est très souvent utilisée avec le *p*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside. Par contre, les activités de l' α -glucosidase de levure de boulanger, de l' α -galactosidase et de l' α -mannosidase sont définies par rapport au *p*-nitrophényl- α -D-glycopyranoside et celle de la β -galactosidase par rapport à l'*o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside.

Le principe général de ces tests consiste à utiliser, comme substrats des glycosidases, des composés libérant des produits détectables dans l'ultraviolet ou dans le visible. Les substrats classiquement utilisés sont des nitrophénylglycopyranosides. En effet, au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible, il est possible de mesurer à 400 nm la vitesse de libération du nitrophénol en dosant l'ion *p*-nitrophénolate (**Schéma 103**).



Ainsi, comme nous l'avons rapporté précédemment, la mesure de cette vitesse pour différentes concentrations en substrat et en inhibiteur nous permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et K_i .

Afin de connaître l'activité de l'enzyme vis-à-vis des substrats utilisés, il est nécessaire de déterminer les constantes de Michaelis correspondantes. Cela permet également de savoir quelles sont les quantités d'enzyme et de substrat nécessaires pour effectuer les mesures de vitesses.

⁵² Gravier-Pelletier, C. ; Maton, W. ; Dintiger, T. ; Tellier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8705-8720.

⁶⁰ (a) Mehta, G. ; Lakshminath, S. ; Talukdar, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 335-338.

Nous avons donc déterminé les K_m de ces enzymes. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 10**.

Enzymes	Substrats	K_m (mM)
α -glucosidase (levure de boulanger)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-glucopyranoside	$0,353 \pm 0,035$
β -glucosidase (amandes)	<i>p</i> -nitrophényl- β -D-glucopyranoside	$2,604 \pm 0,300$
α -galactosidase (grains de café vert)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-galactopyranoside	$0,340 \pm 0,017$
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	<i>o</i> -nitrophényl- β -D-galactopyranoside	$1,752 \pm 0,124$
α -mannosidase (pois sabre)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-mannopyranoside	$0,653 \pm 0,042$

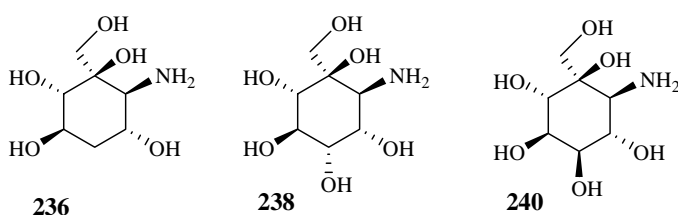
Tableau 10

L'erreur associée à ces constantes de Michaelis a été déterminée à l'aide de la relation suivante (**Équation 6**), où a est la pente, Δa l'erreur sur la pente, b l'ordonnée à l'origine et Δb l'erreur sur l'ordonnée à l'origine.

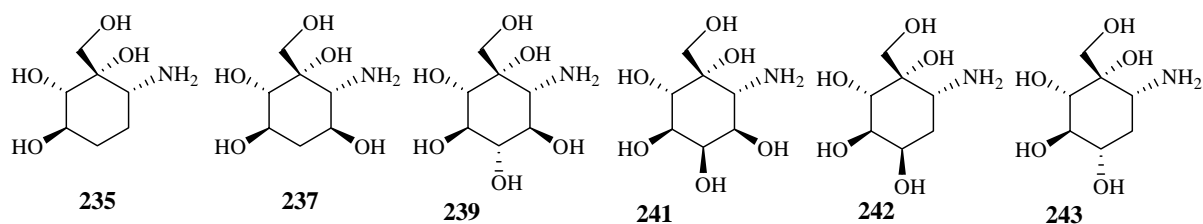
$$\text{Erreur} = \sqrt{\left(\frac{\Delta b}{a}\right)^2 + \left(\frac{b}{a^2} \Delta a\right)^2}$$

Équation 6

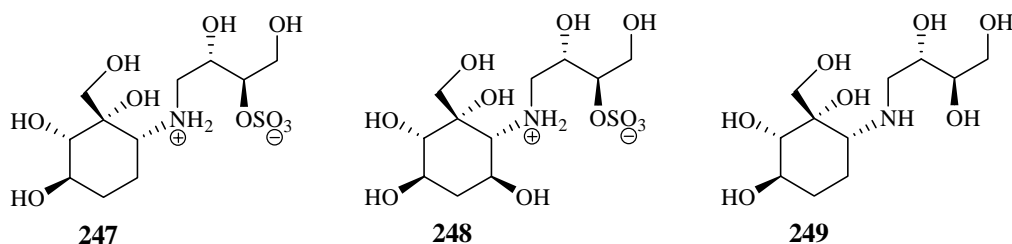
Afin de simplifier la comparaison des activités inhibitrices obtenues, les aminocyclitols seront présentés, selon la stéréochimie des carbones C_1 et C_6 , en deux familles. Les zwitterions et le dérivé *N*-alkylé constitueront la troisième famille (**Figure 46**).



Famille 1



Famille 2



Famille 3

Figure 46

V.5. Première famille

V.5.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur

Dans un premier temps, nous avons déterminé le pourcentage d'activité restante de l'enzyme en présence de la molécule testée. Ce pourcentage nous permet d'estimer la valeur de la constante d'inhibition K_i . Il constitue en fait un premier test qualitatif du potentiel inhibiteur du composé. Cette estimation est déterminée de la façon suivante :

Comme nous l'avons vu, la vitesse d'une réaction enzymatique est donnée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

D'autre part, l'équation donnant la vitesse d'une réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif est :

$$v_i = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

Or le pourcentage d'activité restante (% AR) est défini comme étant le rapport entre la vitesse de libération du nitrophénol en présence d'inhibiteur et cette même vitesse en absence d'inhibiteur.

$$\%AR = \frac{v_i}{v} \times 100 = \frac{[S] + K_m}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \times 100$$

Il est alors possible d'exprimer la constante d'inhibition K_i en fonction du %AR :

$$K_i = \frac{[I]}{\left(\frac{[S]}{K_m} + 1 \right) \left(\frac{100}{\%AR} - 1 \right)}$$

Lors de la détermination de ces pourcentages, les différentes vitesses ont été mesurées pour une concentration en substrat équivalente au K_m et pour une concentration en inhibiteur de 1 mM. L'équation précédente se simplifie donc pour donner :

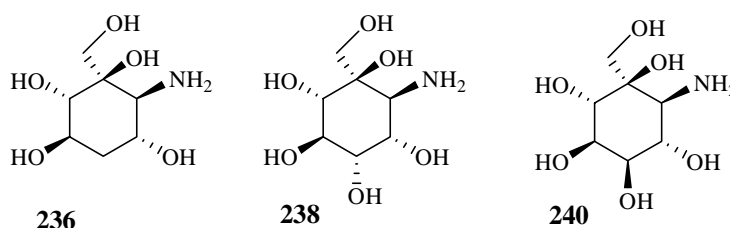
$$K_i = \frac{1}{2 \times \left(\frac{100}{\%AR} - 1 \right)}$$

Ainsi, lorsque le pourcentage d'activité restante est inférieur à 66 %, le K_i est inférieur à 1 mM. S'il est compris entre 67 % et 86 %, le K_i est compris entre 1 mM et 3 mM. Les composés donnant un pourcentage supérieur à 86 % ont été considérés comme non inhibiteurs de l'enzyme testée. Ainsi seules les constantes d'inhibition inférieures à 3 mM ont été déterminées.

Il est important de souligner que deux mesures d'activité restante ont été effectuées pour chaque test : une première mesure après cinq minutes d'incubation de l'enzyme en présence de l'inhibiteur et une seconde après trente minutes d'incubation, afin de vérifier la réversibilité de l'inhibition.

V.5.2. Résultats

Nous avons mesuré le pourcentage d'activité restante des cinq glycosidases présentées précédemment, en présence de chacun des aminocyclitols (**Figure 47**).



Famille 1

Figure 47

Les premiers essais ont montré que les aminocyclitols **236**, **238** et **240** ne sont pas actifs vis-à-vis de l' α -mannosidase, ce qui est pourrait être expliqué par la différence de configurations entre ces aminocyclitols et le substrat naturel de cette enzyme et bien sûr aussi, la position du groupement $-NH_2$. L' α -glucosidase n'est inhibée que faiblement par l'aminocyclitol **238**, ce qui a aussi été observé dans la littérature avec des structures proches de nos aminocyclitols.^{52,56,60} Par contre, ces aminocyclitols ont donné de bons résultats vis-à-vis des deux β -glycosidases testées et de l' α -galactosidase. L'aminocyclitol **238** est le plus actif vis-à-vis de ces enzymes (**Tableau 11**). Et nous avons montré que tous les composés possédant une activité sont des inhibiteurs réversibles.

⁵² Gravier-Pelletier, C. ; Maton, W. ; Dintiger, T. ; Tellier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8705-8720.

⁵⁶ Sureshan, K. M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Watanabe, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 8367.

⁶⁰ Mehta, G. ; Lakshminath, S. ; Talukdar, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 335-338.

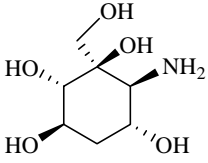
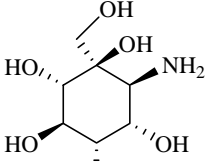
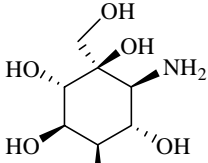
inhibiteur	 236	 238	 240
α -glucosidase (levure de boulanger)	102 %	83 %	94 %
β -glucosidase (amandes)	82 %	46 %	57 %
α -galactosidase (grains de café vert)	92 %	20 %	49 %
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	84 %	63 %	88 %
α -mannosidase (pois sabre)	94 %	96 %	101 %

Tableau 11

V.5.3. Détermination des constantes d'inhibition

V.5.3.a. Principe

Lorsque le pourcentage d'activité est inférieur à 66% et donc le K_i est inférieur à 1 mM, la constante d'inhibition a été déterminée précisément en utilisant la méthodologie décrite précédemment. Les tracés donnant les différents K'_m en fonction de la concentration en inhibiteur ont été obtenus grâce à la représentation de Hanes-Woolf.

Pour les pourcentages d'activité restante situant entre 67% et 83% et donc un K_i compris entre 1mM et 3 mM, la constante d'inhibition a été déterminée rapidement en utilisant,

l'équation de définition de la constante de Michaelis apparente : $K'_m = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$. Il est possible

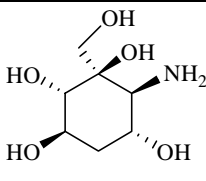
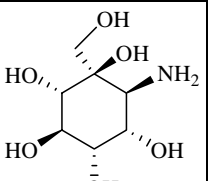
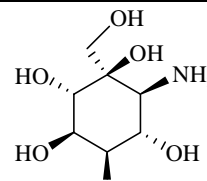
de calculer le K_i , en ne déterminant qu'un seul K'_m , obtenu pour une concentration donnée en inhibiteur.

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K'_m}{K_m} - 1}$$

Dans ce cas, nous n'avons pas déterminé l'erreur sur la valeur obtenue, ni vérifié que l'inhibition est compétitive.

V.5.3.b. Résultats

Les constantes d'inhibition obtenues pour ces aminocyclitols sont regroupées dans le tableau suivant (**Tableau 12**) et sont comparées aux données de la littérature présentées en introduction de cette partie "inhibition".

inhibiteur	K_i en μM		
	 236	 238	 240
α -glucosidase (levure de boulanger)	NI	2530	NI
β -glucosidase (amandes)	2270	$164 \pm 27^\#$	$446 \pm 44^\#$
α -galactosidase (grains de café vert)	NI	$335 \pm 12^\#$	$789 \pm 300^\#$
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	2620	$134 \pm 2^\#$	NI
α -mannosidase (pois sabre)	NI	NI	NI

NI : non inhibiteur ; $^\#$: inhibiteur compétitif ;.

Tableau 12

Ces trois aminocyclitols ne sont pas actifs sur l' α -glucosidase et l' α -mannosidase. **236** est le moins performant des trois, il n'est que très légèrement actif sur la β -glucosidase et la β -galactosidase. En revanche, **238** et **240** ont une bonne activité sur la β -glucosidase et l' α -galactosidase et **238** est aussi inhibiteur de la β -galactosidase.

Il est intéressant de noter que ce qui différencie **236** de **238** et **240** est la présence d'un hydroxyle en position 4 soit de configuration *S* pour **238** soit *R* pour **240**. L'ajout de cet hydroxyle améliore les propriétés inhibitrices très nettement vis-à-vis de la β -glucosidase, de l' α -galactosidase et de la β -galactosidase. Pour la β -glucosidase, la configuration *S* est nettement plus favorable que l'autre, **238** est un meilleur inhibiteur que **240**. Pour l' α -galactosidase, cet hydroxyle supplémentaire est indispensable car seul **238** et **240** sont actifs, avec de nouveau, une plus grande d'efficacité apportée par la configuration *S*. Pour la β -galactosidase, une légère activité est déjà présente sans l'hydroxyle en 4. Mais en revanche, la configuration *R* ne convient pas du tout puisque **240** est totalement inactif sur cette enzyme. On retrouve comme dans le cas des deux autres enzymes, une meilleure activité avec la configuration *S*.

Nous avons essayé de regarder globalement comment les stéréochimies pouvaient correspondre à celles des différents glycosides naturels mais nous n'avons pas trouvé d'éléments de réponse très pertinents (voir annexe). Est-ce que cet hydroxyle en C4 des nitrocyclitols correspondrait à l'hydroxyle en position 2 des glycosides β -glucose, α et β -galactose ? Cet hydroxyle a souvent été jugé comme indispensable pour une bonne activité créant des interactions très favorables avec le site actif. Malheureusement, dans les conformations les plus stables déterminées en solution pour les cyclitols, cet hydroxyle en 4 est axial alors que pour les sucres l'hydroxyle en 2 est équatorial.

Nous pourrions considérer cette famille comme des analogues de série L (CH_2OH en dessous) mais dans ce cas, les configurations par rapport aux substrats naturels ne correspondent pas non plus.

V.6. Deuxième famille

Cette famille a aussi été testée sur les cinq glycosidases disponibles au laboratoire.

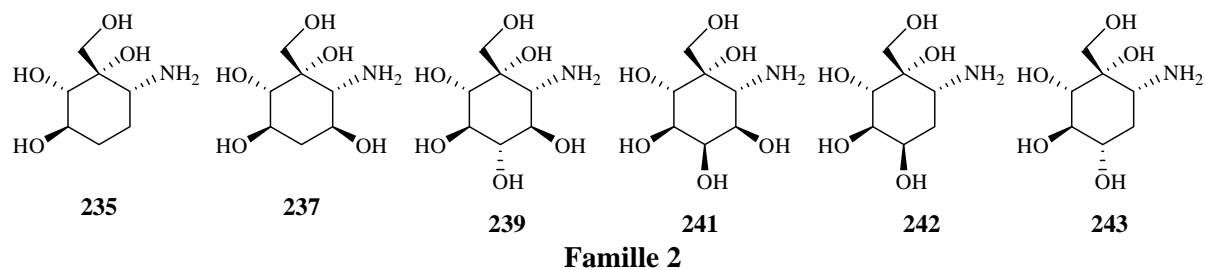


Figure 48

V.6.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur

Nous avons de la même façon que précédemment déterminé le pourcentage d'activité restante des enzymes en présence des molécules testées. Nos résultats mesurés en présence de différents aminocyclitols de la deuxième famille sont donnés dans le tableau suivant (**Tableau 13**)

Les aminocyclitols de la deuxième famille montrent également des activités inhibitrices, en particulier l'aminocyclitol **235** qui semble être un très bon inhibiteur de la β -galactosidase. Les aminocyclitols **237** et **239** ont aussi montré des activités intéressantes vis-à-vis de la β -glucosidase.

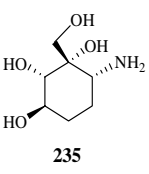
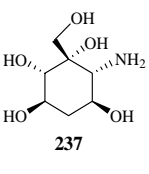
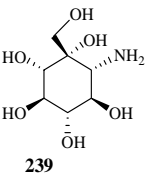
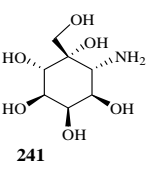
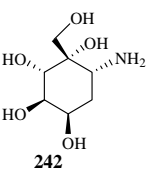
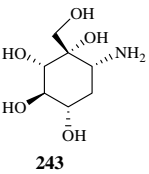
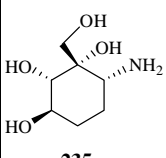
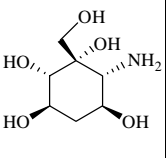
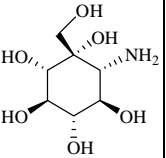
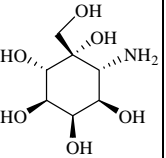
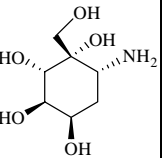
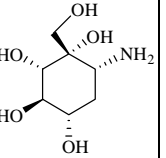
inhibiteur	 235	 237	 239	 241	 242	 243
α -glucosidase (levure de boulanger)	101%	101%	84%	100%	100%	87%
β -glucosidase (amandes)	78%	53%	61%	71%	96%	94%
α -galactosidase (grains de café vert)	99%	93%	80%	86%	98%	87%
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	26%	74%	86%	76%	68%	96%
α -mannosidase (pois sabre)	93%	96%	95%	80%	88%	91%

Tableau 13

V.6.2. Détermination des constantes d'inhibition

De la même façon que pour la première famille, nous avons déterminé les constantes d'inhibition associées aux aminocyclitols de la deuxième famille. Ainsi selon le pourcentage d'activité restante obtenu, nous avons effectué soit une détermination précise avec différents K'_m , soit une détermination rapide avec un seul K'_m .

Les K_i obtenu pour ces aminocyclitols sont regroupés dans le **Tableau 14**. Dans le cas des déterminations précises de K_i , les droites obtenues à différentes concentrations en inhibiteur sont parallèles, les inhibiteurs correspondants sont donc compétitifs (Annexe). Nous avons montré que tous les aminocyclitols de la deuxième famille possédant une activité sont des inhibiteurs réversibles.

inhibiteur	K_i en μM					
	 235	 237	 239	 241	 242	 243
α -glucosidase (levure de boulanger)	NI	NI	2620	NI	NI	NI
β -glucosidase (amandes)	2060	$117 \pm 28^\#$	$532 \pm 30^\#$	1220	NI	NI
α -galactosidase (grains de café vert)	NI	NI	2000	NI	NI	NI
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	$40 \pm 1,5^\#$	1460	NI	1580	1015	NI
α -mannosidase (pois sabre)	NI	NI	NI	2000	NI	NI

NI : non inhibiteur ; $^\#$: inhibiteur compétitif

Tableau 14

On remarque que cette famille n'inhibe pas (ou vraiment très peu) l' α -mannosidase et l' α -glucosidase comme dans le cas de la première famille. On peut aussi ajouter cette fois l' α -galactosidase. Nos molécules ne sont vraiment actives que sur les β -galactosidase et β -glucosidase. On peut donc penser que ces aminocyclitols sont plus spécifiques des β -glycosidases. En comparant avec la valioline **2** et la validamine **40**, le changement de la position du groupement NH_2 permet une légère amélioration de l'inhibition avec une modification de la sélectivité vers les β -glycosidases. C'est peut être dû à la position équatoriale de ce même groupement NH_2 . On peut remarquer une certaine analogie de structure entre la nojirimycine (**4**, fig. 18) et **239** ainsi qu'entre la mannojirimycine et **241**. Nos composés possèdent un groupement CH-NH_2 à la place d'un NH dans les pipéridines citées. Cette modification provoque un abaissement important du pouvoir inhibiteur : pour la nojirimycine on a $K_i = 330 \mu\text{M}$ α -glu, $0,9 \mu\text{M}$ β -glu, $500 \mu\text{M}$ α -man et pour la mannojirimycine on a $\text{IC}_{50} 1 \text{ mM}$ α -glu, $K_i = 20 \mu\text{M}$ β -glu, $1,2 \mu\text{M}$ α -man.[†] On peut aussi

[†] *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 254-381.

noter que parmi tous nos aminocyclitols, le seul à être légèrement actif sur l' α -mannosidase est le composé **241** (2mM) sans doute à cause des stéréochimies semblables à celles du mannose.

Concernant la β -glucosidase, l'aminocyclitol **237** est le meilleur inhibiteur, alors que les aminocyclitols **235**, **239** et **241** inhibent modestement cette enzyme. Cette inhibition est perdue avec les aminocyclitols **242** et **243**. Ce qui signifie que l'hydroxyle équatorial en position 5 est très important pour une bonne inhibition et que celui en position 4 a un effet négatif qui provoque une diminution de l'activité (**239** et **241**) qui va jusqu'à sa perte totale (**242** et **243**) quand l'hydroxyle en position 5 est absent.

Concernant la β -galactosidase, c'est l'aminocyclitol le plus simple **235** qui a donné une bonne inhibition. Ce résultat est très surprenant, car on aurait pu penser que l'ajout des groupements hydroxyles aurait pu améliorer l'activité. Ce n'est pas le cas et contrairement au cas de la β -glucosidase, l'addition des groupements hydroxyles a un effet négatif. Celui qui est le plus remarquable est l'hydroxyle en 4 de configuration *S* (**239** et **242**), sa présence provoque la perte totale d'activité. En même position mais de configuration *R*, cet hydroxyle est mieux toléré (**242**). Mais de la même façon, l'hydroxyle en position 5 au dessus du plan (**237** et **241**) n'est pas non plus bien accepté.

D'une manière générale, avec cette famille non plus, nous n'avons pas trouvé d'éléments très pertinents de comparaison entre les stéréochimies de nos composés et celles des glycosides naturels.

V.6.3. Cas particulier de l'aminocyclitol **239**

Pour l'étude de l'inhibition de la β -glucosidase d'amandes par l'aminocyclitol **239**, nous avons été confrontés à un comportement particulier de **239** vis-à-vis de cette enzyme. En effet, lors de la mesure de l'activité restante en présence de l'aminocyclitol **239** au bout de cinq et trente minutes d'incubation, nous avons obtenu des valeurs différentes (70% et 53% respectivement). Cela montre que l'aminocyclitol **239** est un inhibiteur lent ("slow binding") de la β -glucosidase d'amandes. Ce phénomène a été observé par Bols et coll avec la même enzyme en présence de la 1-désoxynojirimycine **5**, l'isofagomine **9** et quelques analogues.¹³⁹

Pour la détermination de K_i , nous avons laissé l'enzyme en présence de l'inhibiteur trente minutes au lieu de cinq minutes pour les autres mesures. Dans ces conditions, nous avons retrouvé un comportement d'inhibiteur compétitif.

V.7. Troisième famille

Les pourcentages d'activité restante obtenus en présence des deux zwitterions et le dérivé *N*-alkylé de l'aminocyclitol **235** sont donnés dans le tableau suivant (**Tableau 15**).

Les résultats obtenus sont décevants, puisque ni les deux zwitterions ni le dérivé *N*-alkylé ne sont inhibiteurs des glycosidases testées. Ces modifications de structure que nous avons réalisé ne sont donc pas favorables. Vraisemblablement, l'addition d'une chaîne associant un ion ammonium et un ion sulfate (**247** et **248**), comme nous l'avons déjà montré auparavant

¹³⁹ (a) Lohse, A. ; Hardlei, T. ; Jensen, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *Biochem. J.* **2000**, 349, 211. (b) Bülow, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8567. (c) Bülow, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, 1545, 207. (d) Bülow, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *Anal. Biochem.* **2001**, 295, 186.

dans le cas de pipéridines,¹⁴⁰ n'est pas un bon modèle pour ces enzymes. C'est-à-dire que la situation où il existe une charge positive permanente, contrairement à ce que l'on pourrait penser, n'apporte rien et ce notamment pour les β -galactosidase et β -glucosidase. Dans le cas de la chaîne polyhydroxylée (**249**), il y a aussi disparition totale de l'inhibition vis-à-vis de la β -galactosidase. L'ajout de cette chaîne n'est pas favorable.

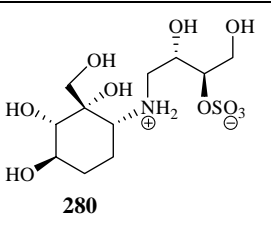
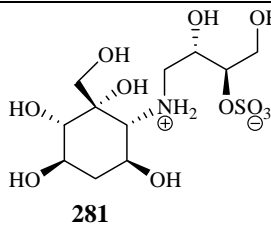
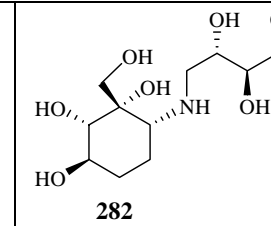
inhibiteur	 280	 281	 282
α -glucosidase (levure de boulanger)	117%	115%	111%
β -glucosidase (amandes)	101%	103%	95%
α -galactosidase (grains de café vert)	95%	105%	112%
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	98%	98%	97%
α -mannosidase (bois de sabre)	96%	97%	92%

Tableau 15

V.8. Conclusion

Des trois familles, celle qui s'est révélée la plus active est la première. Cela nous a un peu surpris car c'est la deuxième famille qui possède le plus d'analogies de configuration avec les substrats naturels. Mais comme nous l'avons un peu discuté, il est difficile finalement de comparer directement ces analogies structurales. Nous ne savons pas comment les inhibiteurs se positionnent dans le site actif sachant que le NH_2 n'est pas en position de mime du carbone anomérique ni en position de mime de l'hydroxyle anomérique.

Si on compare avec les produits naturels tels que la validamine, valioline et analogues, nos molécules ont de bonnes activités vis-à-vis de certaines glycosidases. Les meilleures se situent dans la centaine de μM , ce qui est nettement mieux que celles données dans le tableau en introduction de ce paragraphe (**Tableau 9**).

Il faut aussi ajouter que nos produits ont montré une certaine sélectivité que nous essaierons d'exploiter par la suite. Par exemple nous pourrions introduire une longue chaîne alkyle (non polyhydroxylée car ce n'est pas favorable) et tester les produits sur des enzymes impliquées dans les maladies génétiques lysosomales.

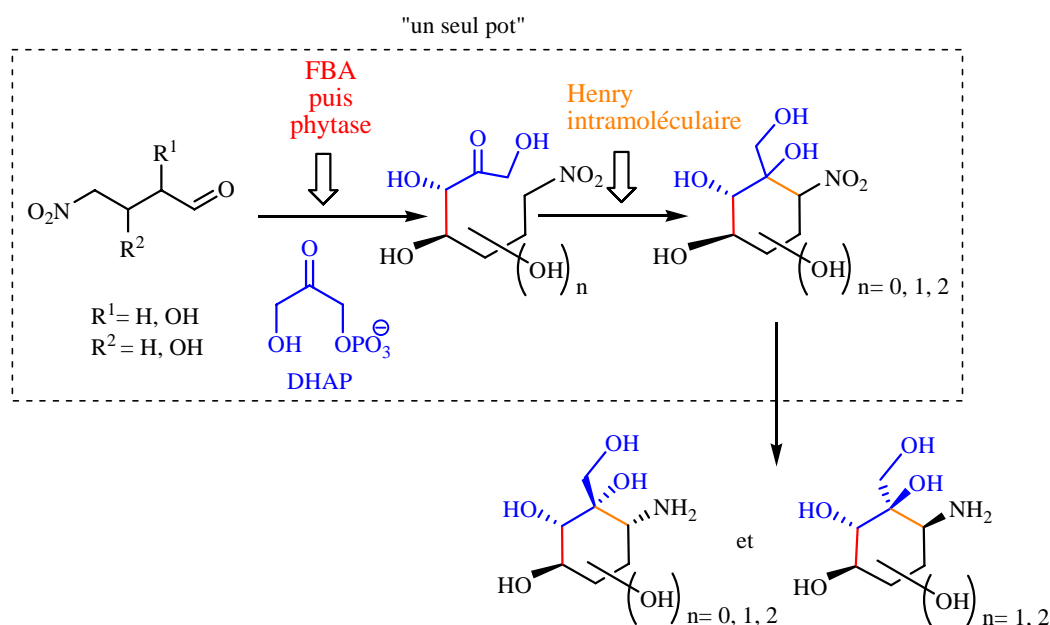
¹⁴⁰ Gallienne, E. ; Gefflaut, T. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 894.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

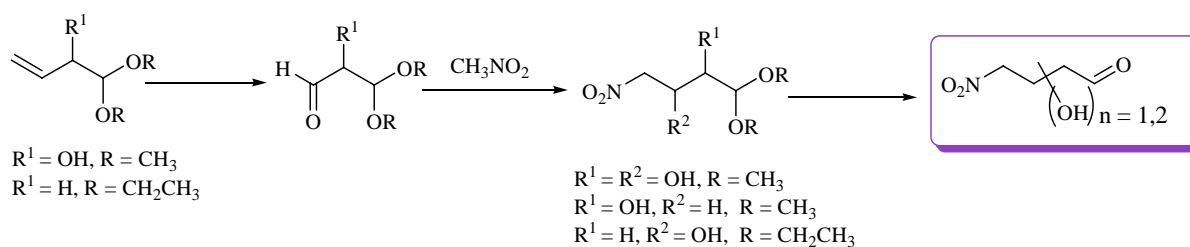
Les objectifs de ce travail étaient :

- la synthèse chimioenzymatique d'aminocyclitols, analogues de la valioline, de la valioline, de la valioline,
- l'évaluation de leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de quelques glycosidases commerciales,
- et en parallèle, développer une synthèse efficace du DHAP, substrat indispensable pour l'utilisation de la FBA.

Nous avons préparé ces aminocyclitols à partir de tous les différents hydroxyaldéhydes nitrés que nous avons envisagé. Nous avons ainsi développé une voie originale basée sur un procédé en un seul pot mettant en jeu deux enzymes et trois réactions : une aldolisation, une désphosphorylation et une nitroaldolisation intramoléculaire (**Schéma 104**). Au cours de ce procédé, deux liaisons C-C sont formées de façon hautement stéréosélective. Un stéréoisomère est créé par l'aldolase qui par la suite se cyclise pour donner un ou deux nitrocyclitols dépendant de la présence d'un groupement $R^2 = OH$ ou non. Nous avons ainsi accès à deux familles d'aminocyclitols.

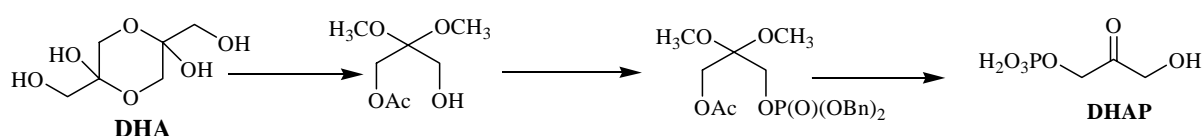


Cette stratégie nous a aussi donné la possibilité de préparer tous les précurseurs aldéhydiques nitrés correspondants. Nous avons préparé le 4-nitrobutanal, en améliorant ce qui était décrit dans la littérature. Pour faire varier le nombre et les positions des groupements hydroxyles portés par le cycle, nous avons également développé la synthèse des différents nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés protégés qui n'avaient jamais été décrits jusqu'à présent.



Ces nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés ont été préparés par une réaction d'aldolisation de type Henry. Nous avons réalisé les synthèses en version racémique et optiquement active, en dédoublant quelques intermédiaires grâce à des lipases. Tous les aldéhydes sont de bons substrats de l'aldolase ce qui nous a permis d'explorer toutes les potentialités de la cyclisation intramoléculaire.

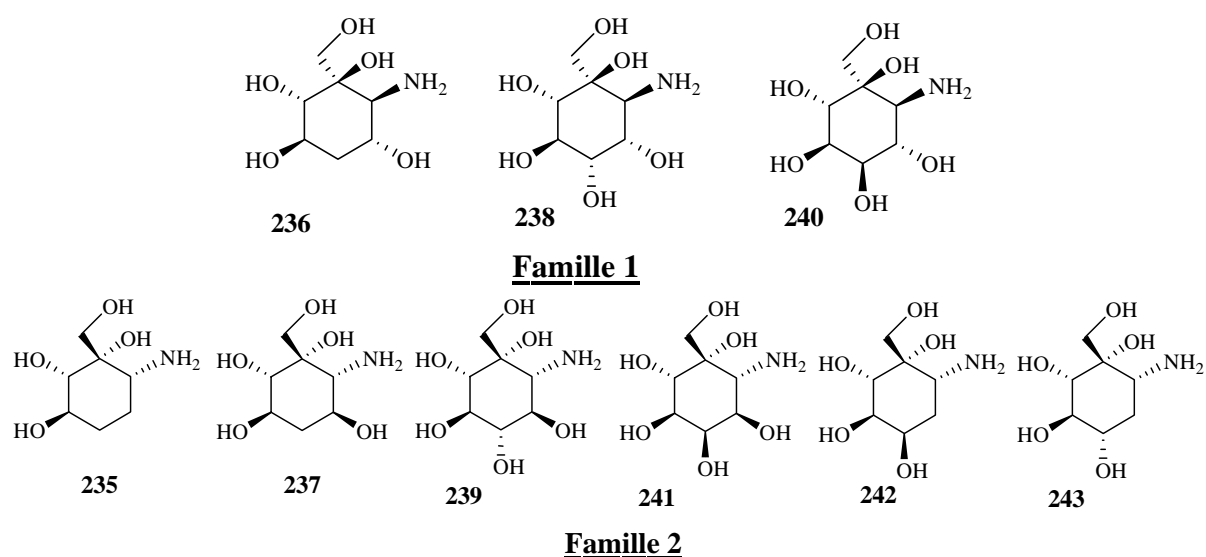
En parallèle, nous avons également mis en place une méthode originale et efficace de synthèse du DHAP. Nous avons travaillé de façon à mettre en jeu des quantités de précurseur qui permettent de préparer des solutions très concentrées en DHAP, plus pratiques pour les synthèses avec la FBA car nos aldéhydes sont déjà en solution aqueuse diluée. De plus, ce DHAP est très pur (**Schéma 106**).



Afin d'accéder à une famille d'inhibiteurs analogues du salacinol, nous avons couplé deux aminocyclitols avec un sulfate cyclique donnant ainsi des structures originales zwitterioniques. L'hydrolyse du sulfate sur l'un d'entre eux a permis l'accès à une molécule pouvant être considérée comme un analogue du voglibose (**Figure 49**).

Tous les aminocyclitols et les nitrocyclitols préparés selon cette voie sont des composés nouveaux, ils ont été caractérisés par des méthodes spectroscopiques et analytiques.

L'ensemble de ces nouvelles structures aminés est présenté dans la figure ci-dessous.



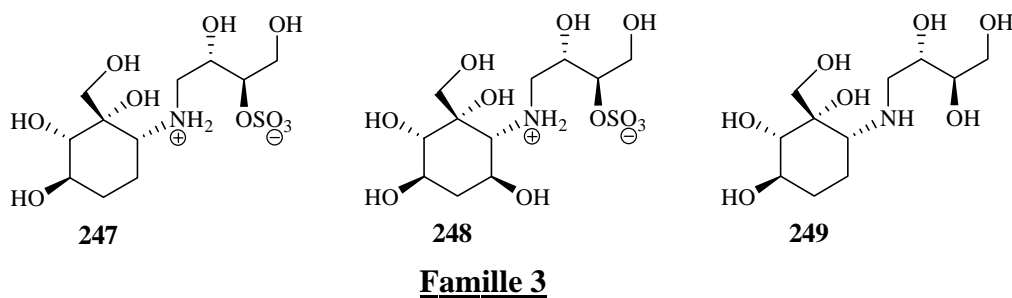


Figure 49

L'évaluation des propriétés inhibitrices des aminocyclitols, analogues de la valioline, a permis de mettre en évidence un certain potentiel d'inhibition bien que le groupement -NH_2 ne soit pas en bonne position pour être un vrai mime de l'état de transition. Pour la première famille, le meilleur inhibiteur est **238** ($164 \mu\text{M}$, β -glucosidase), ($335 \mu\text{M}$, α -galactosidase) et (134 , β -galactosidase). Pour la deuxième famille, il s'est dégagé une certaine sélectivité vis-à-vis de la β -glucosidase (**237**) et de la β -galactosidase (**235**). Par contre, les zwitterions et le composé N-alkylé n'ont pas montré de propriétés inhibitrices vis-à-vis des glycosidases testées. Ce ne sont donc pas de bons modèles.

Cette méthodologie est performante, donnant accès à des molécules polyfonctionnelles et énantiomériquement pures. Nous nous sommes bien souvent affranchis d'étapes lourdes de protection-déprotection rencontrées habituellement dans les synthèses totales utilisant des substances naturelles comme pool chiral. Les objectifs fixés initialement ont donc été atteints.

Tous ces résultats sont très encourageants et ouvrent de nombreuses perspectives. En voici quelques exemples :

➤ Nous étudierons l'enchaînement des réactions qui permettra de déplacer la fonction amine vers une position identique à celle de la valioline. Ce sont les nitrocyclitols qui portent un hydroxyle en alpha du groupement nitro qui pourront être utilisés dans cet objectif. Cette fonction amine peut être introduite en position 5 en réalisant une élimination pour former une nitrooléfine sur laquelle on peut effectuer une réaction de Michael avec une amine ou l'ammoniac ($R = H$ ou alkyle). Le groupement $-NO_2$ est ensuite réduit. Ces réactions ont déjà toutes été décrites dans la littérature sur des composés analogues.⁴⁹

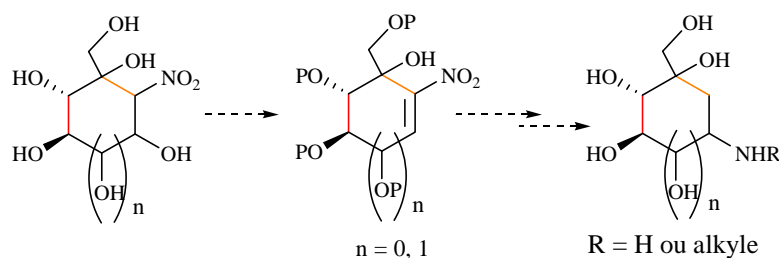


Schéma 107

D'autre part, cette méthode de synthèse d'aminocyclitols peut être développée et étendue pour préparer des amines présentant d'autres stéréochimies. Pour cela, nous envisageons d'utiliser d'autres aldolases qui ont une stéréosélectivité différente de celle de la FBA.

➤ A partir des mêmes substrats aldéhydiques et en utilisant les deux autres DHAP-aldolases applicables en synthèse on peut envisager de préparer les nitrocyclitols suivants (**Schéma 108**).

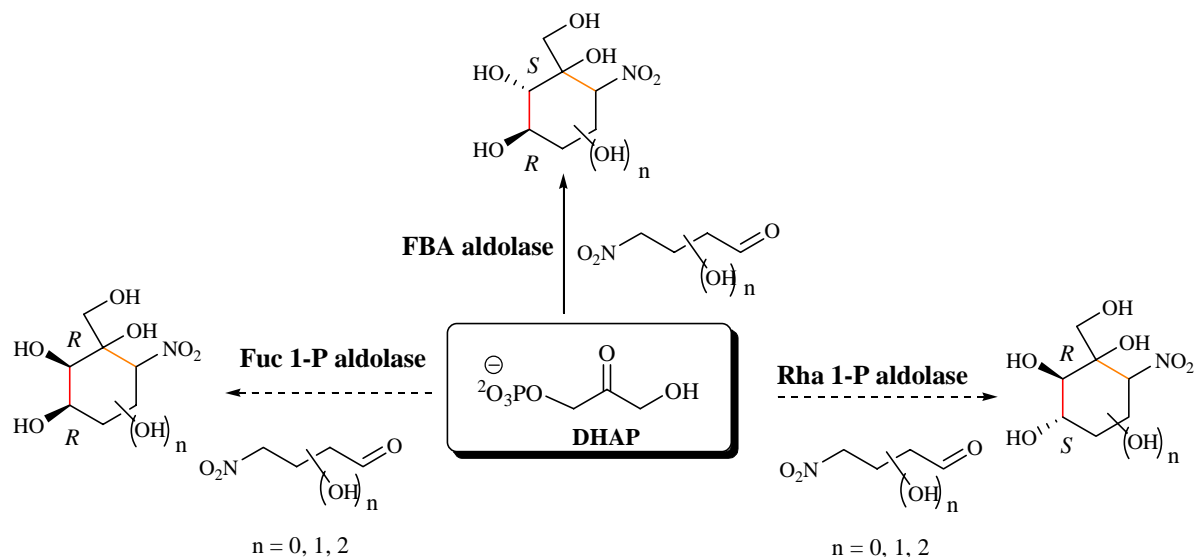


Schéma 108

⁴⁹ Yoshikawa, M. ; Cha, B. C. ; Okaichi, Y. ; Takinami, Y. ; Yokokawa, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4236.

Il sera alors intéressant de voir si la réaction de Henry permettra d'accéder aux mêmes configurations **1R,6S** ou/et **1S,6R**. Peut être que la stéréochimie **2S** apportée par la FBA influençait aussi la stéréosélectivité de la nitroaldolisation.

➤ La KDPG aldolase doit pouvoir accepter les aldéhydes α -hydroxylés de configuration **R** comme substrats (**Schéma 109**). On aurait ainsi accès à un autre groupement fonctionnel que l'hydroxyméthyle, permettant d'envisager d'autres inhibiteurs potentiels notamment actifs sur des glucuronidases ou plus largement des "uronidases".

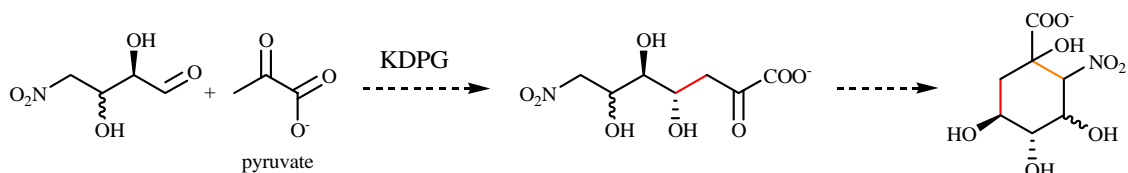


Schéma 109

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Généralités

I.1. Nomenclature et numérotation

Dans la majorité des cas, la nomenclature utilisée est la nomenclature officielle recommandée par l'IUPAC. Cependant, lorsque c'est possible, la nomenclature spécifique appliquée aux glucides est privilégiée.

Par contre, la numérotation des atomes utilisée pour l'interprétation des spectres de RMN est le plus souvent arbitraire. Elle est mentionnée dans chaque cas sur les molécules encadrées.

I.2. Techniques chromatographiques

Les **chromatographies sur couches minces** (CCM) ont été effectuées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK). La révélation a été faite, sauf mention contraire, par exposition sous rayons ultraviolets et par trempage dans une solution de vanilline suivi d'un chauffage ou dans une solution de KMnO₄. L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas.

Les **chromatographies sur colonne** ont été réalisées sur gel de silice GEDURAN Kieselgel Si 60 (40-63 µm, MERCK) selon la technique de "chromatographie éclair". L'éluant utilisé est indiqué pour chaque composé.

Les **purifications sur résine** ont été effectuées sur une résine échangeuse de cations DOWEX 50WX8 (200-400 mesh ; FLUKA) sous forme H⁺, lavée à l'ammoniaque 1N et régénérée au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 1N.

I.3. Techniques spectroscopiques et d'analyse

Les **spectres infrarouges** (IR) ont été réalisés sur un appareil PERKIN ELMER 881 ou un appareil PERKIN-ELMER FT-IR Paragon 500 sous forme de film entre deux lames de NaCl, sous forme de pastille de KBr ou en solution dans le solvant indiqué. Les nombres d'onde sont donnés en cm⁻¹.

Les **spectres de masse** ont été réalisés sur un appareil Hewlett Packard 5989B. Le mode d'ionisation utilisé est mentionné dans chaque cas (IC : ionisation chimique ; IE : impact électronique ; ESI : électrospray).

Les **spectres de masse haute résolution** ont été effectués par le Centre Régional de Mesures Physiques de Clermont-Ferrand sur un spectromètre Haute Résolution QTOF micro WATERS, en électrospray (ESI), en ionisation en phase liquide (LSIMS) ou en ionisation chimique (IC) en mode positif (+).

Les **spectres de Résonance Magnétique Nucléaire** (RMN) ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AVANCE 400 (¹H : 400 MHz ; ¹³C : 100,6 MHz) ou BRUKER AVANCE 500 (pour les spectres NOESY). Les spectres du ¹³C ont été réalisés en JMOD

pour un plus grand confort d'interprétation. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et déterminés par rapport au solvant deutéré utilisé, qui est précisé pour chaque composé. Dans le cas de D₂O, les spectres de ¹³C sont calibrés automatiquement par rapport à la fenêtre spectrale.

Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont les suivantes :

s : singulet	ddd : doublet de doublets dédoublé
se : singulet élargi	t : triplet
ps : pseudo singulet	td : triplet dédoublé
d : doublet	pt : pseudo triplet
pd : pseudo doublet	q : quadruplet
d _{AB} : doublet d'un système AB	pq : pseudo quadruplet
dd : doublet dédoublé	m : multiplet

Les spectres de RMN du ¹H ont été utilisés pour déterminer les rapports diastéréoisomériques des mélanges obtenus.

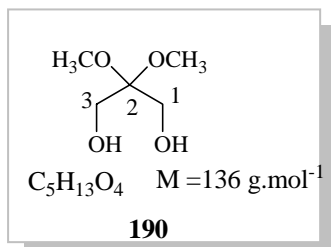
Les **pouvoirs rotatoires** ont été mesurés sur un polarimètre JASCO modèle DIP-370 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm) à 25°C. Le solvant utilisé et la concentration qui est donnée en g/100 mL.

Les **points de fusion** ont été mesurés avec un microscope à platine chauffante REICHERT et sont non corrigés.

Les **analyses élémentaires** ont été effectuées par le Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison (Rhône).

II. Synthèse du DHAP

2,2-diméthoxypropane-1,3-diol 190



A une solution de DHA dimère (20 g, 111 mmol, 1 éq) dans 200 mL de méthanol anhydre, on ajoute du triméthylorthoformate (24 mL, 184 mmol, 1,65 éq) et de l'acide p-toluènesulfonique monohydrate (80 mg, 0,45 mmol, 0,004 éq). La solution est agitée 24 heures à température ambiante sous atmosphère d'argon. On neutralise le milieu par une résine basique Amberlyst A 26 (2,2 g), sous forme OH^- , puis on filtre sur fritté et évapore à sec. On obtient 30 g d'un solide brut légèrement jaune.

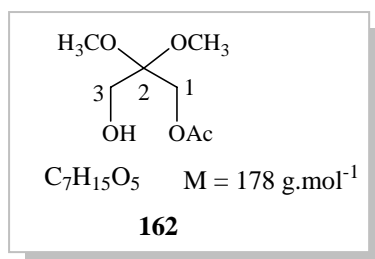
Rendement : quantitatif.

Rf = 0,46 (AcOEt/Cyclohexane : 6/4).

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ : 3,58 (s, 4H, CH_2) ; 3,28 (s, 6H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 102,4 (C_2) ; 59,6 (CH_2) ; 48,5 (OCH_3).

Acétate de 3-hydroxy-2,2-diméthoxypropyle **162**



A une solution de **190** (30 g, 220 mmol, 1 éq) dans 450 mL d'un mélange acétate de vinyle/isopropyléther (2/1), on ajoute 600 mg de lipase PS (Amano AK). La solution est agitée 18 heures à 30°C. On filtre sur fritté et on évapore à sec. Le produit est purifié par distillation sous pression réduite (0,1 mm Hg, 72°C). On obtient 23,88 g d'une huile incolore.

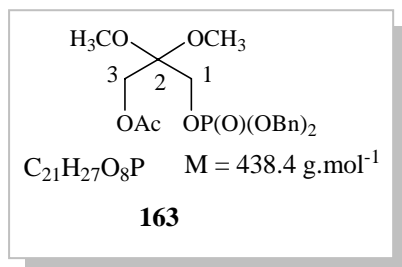
Rendement = 61 %.

Rf = 0,36 (cyclohexane/AcOEt : 5/5)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,18 (s, 2H, H_1) ; 3,57 (s; 2H, H_3) ; 3,27 (s, 6H, OCH_3) ; 2,1 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 171 (CO) ; 99,8 (C_2) ; 60,2 (C_3) ; 59,8 (C_1) ; 48,5 (OCH_3) ; 20,8 (CH_3).

Phosphate de 3-acétoxy-2,2-diméthoxypropyle et de dibenzyle 163



On prépare une solution de tribenzylphosphite (16,7 g, 47,4 mmol, 2,1 éq) dans 100 mL de CH_2Cl_2 anhydre à -30°C puis on ajoute I_2 (11,86 g, 45,14 mmol, 2 éq). Cette solution est ensuite ajoutée à une solution de **162** (4 g, 22,5 mmol, 1 éq) et de pyridine anhydre (7,2 mL, 90 mmol, 4 éq) dans 120 mL de CH_2Cl_2 anhydre à -30°C sous atmosphère d'argon. Une fois l'addition terminée (20 minutes), le mélange est agité à -10°C puis à température ambiante durant 30 minutes. Le milieu est filtré sur célite, évaporé à sec et extrait par 180 mL d'un mélange éther/eau (5/1). La phase organique est lavée par 50 mL de KHSO_4 (0,3 M), 50 mL de NaHCO_3 saturé et 100 mL de NaCl saturé. Puis elle est échée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane/ AcOEt : 6/4). On obtient 9,13 g d'une huile incolore.

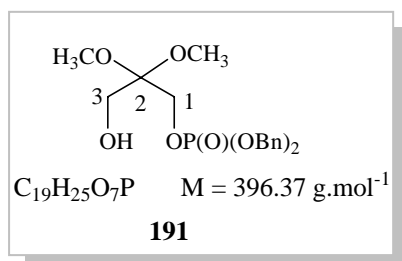
Rendement = 92 %.

Rf = 0,42 (cyclohexane/ AcOEt : 7/3).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,38 (s, 10H, H_{arom}) ; 5,08 (m; 4H, OCH_2) ; 4,15 (s, 2H, H_3) ; 4,02 (d, 2H, H_1) ; 3,22 (s, 6H, OCH_3) ; 2,2 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 170,1 (CO) ; 135,7 (C_{arom}) ; 128,6-127,9 (C_{arom}) ; 98,9 (C_2) ; 69,4 (OCH_2) ; 62,7 (C_1) ; 59,5 (C_3) ; 48,4 (OCH_3) ; 20,7 (CH_3).

Phosphate de dibenzyl-3-hydroxy-2,2-diméthoxypropyle 191



A une solution de **163** (1,5 g, 3,42 mmol, 1 éq) dans 20 mL de MeOH, on ajoute une solution de NaOH (1M) (3,42 mL, 3,42 mmol, 1 éq). Le mélange est agité à température ambiante pendant 45 minutes. Le milieu réactionnel est extrait trois fois par 150 mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. On obtient 1,35 g d'un liquide incolore.

Rendement : quantitatif.

Rf = 0,41 (cyclohexane/AcOEt : 4/6).

IR (Et_2O) ν (cm^{-1}) : 3411 (OH) ; 1497-1455 (C=C) ; 1381 (CH_2) ; 1090 (CO) ; 893 (C-H phényle).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+Na]^+$: masse théorique = 419,1236
masse trouvée = 419,1236

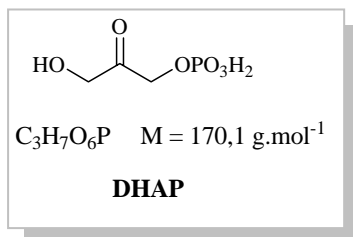
Analyse élémentaire : $C_{19}H_{25}O_7P$ (396,3)

	C %	H %	P%
Calculé :	57,57	6,36	7,81
Trouvé :	57,52	6,52	7,80

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,28 (s, 10H, H_{arom}) ; 4,97 (m, 4H, OCH_2 , syst AB) ; 3,89 (d, 2H, H_1 , $J_{H-P} = 8,8$ Hz) ; 3,52 (s, 2H, H_3) ; 3,18 (s, 6H, OCH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 135,5 (C_{arom}) ; 128,7-128 (C_{arom}) ; 100,2 (C_2) ; 69,7 (OCH_2) ; 62,4 (C_1) ; 59 (C_3) ; 48,4 (OCH_3).

Dihydroxyacétone phosphate DHAP



Voie A

Une solution méthanolique (5 mL) de produit **163** (423 mg, 1 mmol) est placée sous atmosphère d'hydrogène en présence de Pd/C (20 mg) et agitée pendant 30 minutes. Une fois la réaction terminée, le charbon palladié est éliminé par ultra filtration. Le pH de la solution vaut 1 et n'a donc pas besoin d'être ajusté. La solution est concentrée sous pression réduite, puis reprise par 4 mL d'eau sous agitation à 65°C. La formation du DHAP est suivie par dosage spectrophotométrique (voir annexes).

Dès que la concentration en DHAP commence à diminuer, on refroidit le milieu réactionnel à 0 °C et on ajuste le pH à 3,7 avec NaOH (3 N). On obtient un rendement de 75 % en DHAP après 3 heures. Le rendement est calculé à partir de **163**.

Voie B

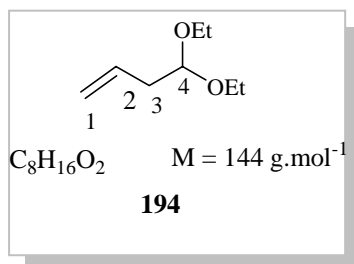
Le produit **191** (1,35 g, 3,54 mmol) est repris par 20 mL de méthanol et placé sous atmosphère d'hydrogène en présence de Pd/C (80 mg) et agitée pendant 30 minutes. Une fois la réaction terminée, le charbon palladié est éliminé par ultra filtration. La solution est concentrée sous pression réduite, puis reprise par 6 mL d'eau sous agitation à 45°C. La formation du DHAP est suivie par dosage spectrophotométrique (voir annexes).

Dès que la concentration en DHAP commence à diminuer, on refroidit le milieu réactionnel à 0 °C et on ajuste le pH à 3,7 avec NaOH (3N). On obtient un rendement de 83 % en DHAP après 50 min. Ce rendement est calculé à partir de **163** pour les trois dernières étapes.

III. Les acétals, précurseurs de la réaction de Henry

III.1. Synthèse des alcènes

4,4-diéthoxybut-1-ène 194



Dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant, d'une ampoule à brome et d'un thermomètre, on ajoute $BF_3/(Et)_2O$ (1 mL, 10 mmol) à 25mL d'éther et d'acétate mercurique $Hg(OAc)_2$ (4,75g, 15 mmol). L'ensemble est agité à température ambiante et on additionne goutte à goutte, pendant 20 min, le vinyléther (72 g, 1 mol). La température est maintenue entre 40 °C et 50 °C en refroidissant le mélange quand cela est nécessaire.

La solution est agitée jusqu'à ce qu'elle revienne à température ambiante, on ajoute alors 50 mL de $NaHCO_3$ à 10 %. La solution obtenue, de couleur verte foncée, est filtrée sur papier, la phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et évaporée sous pression réduite. Le résidu est distillé sous pression réduite à 80 mmHg (106 °C). On obtient 36,14 g d'une huile incolore.

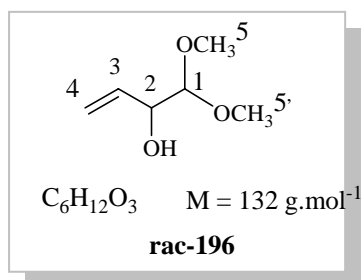
Rendement = 52%.

Rf = 0,82 (cyclohexane/ AcOEt: 6/4) (rév : solution de $KMnO_4$).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,72 (m, 1H, H_2) ; 5,04 (dd, 2H, H_1 , $J_{H1-H2} = 8 \text{ Hz}$, $J_{H1'-H2} = 15 \text{ Hz}$) ; 4,43 (t, 1H, H_4 , $J_{H4-H3} = 7 \text{ Hz}$) ; 3,59 (m, 2H, OCH_2) ; 3,45 (m, 2H, OCH_2) ; 2,32 (m, 2H, H_3) ; 1,13 (t, 6H, CH_3 , $J = 7 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ : 134,1 (C_2) ; 117,9 (C_1) ; 103,0 (C_4) ; 61,8 (OCH_2) ; 39,1 (C_3) ; 15,9 (CH_3).

1,1-diméthoxybut-3-èn-2-ol rac-196



Une solution de bromure de vinyle magnésium (1 M) (100 mL, 0,1 mol) dans le THF est additionnée goutte à goutte et sous argon à une solution de 1,1-diméthoxyacétaldéhyde dans le *t*-butylméthyléther 45 % (26 mL, 0,1 mol). L'agitation est maintenue 2 heures. La solution est alors hydrolysée par une solution aqueuse saturée en NH_4Cl , puis extraite par de l'éther. Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution aqueuse saturée en $NaCl$, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant: éther/pentane : 4/6). On obtient 7,1 g d'une huile incolore.

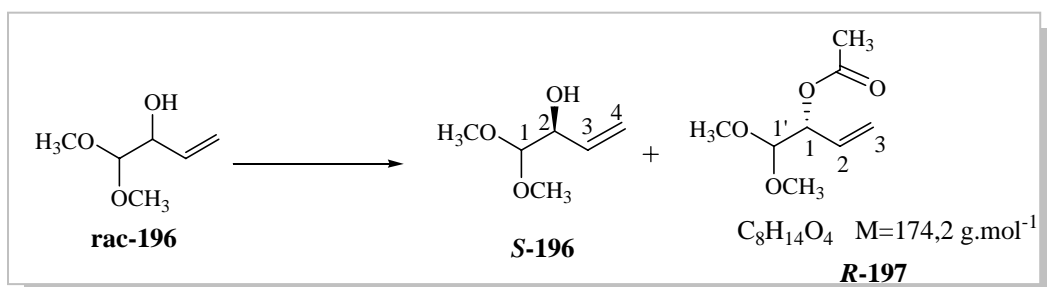
Rendement = 54 %.

Rf : 0,4 (AcOEt/Cyclohexane : 4/6).

RMN¹H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,86 (dd, 1H, H_3 , $J_{H_3-H_4} = 17 \text{ Hz}$, $J_{H_3-H_2} = 10 \text{ Hz}$) ; 5,37 (d, 1H, H_4 , $J_{H_4-H_3} = 17 \text{ Hz}$) ; 5,20 (d, 1H, H_4' , $J_{H_4'-H_3} = 10 \text{ Hz}$) ; 4,13 (d, 1H, H_1 , $J_{H_1-H_2} = 5 \text{ Hz}$) ; 4,08 (m, 1H, H_2) ; 3,40 (s, 3H, H_5) ; 3,37 (s, 3H, H_5') ; 2,51 (se, 1H, OH).

RMN¹³C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 135,5 (C_3) ; 116,7 (C_4) ; 106,5 (C_1) ; 72,1 (C_2) ; 54,9 (C_5) ; 54,5 (C_5').

Dédoublément cinétique du composé 196



L'alcène **rac-196** (4,4 g, 33,8 mmol) est dissous dans de l'acétate de vinyle (60 mL). La lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 435, 4,4 g) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 36 heures à température ambiante. La réaction, suivie par CCM et CPV chirale, est stoppée par filtration. Le solvant est évaporé et le mélange de produits est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : pentane/éther : 6/4). On isole d'une part l'alcool (2,109 g, 15,7 mmol, rdt 46%, ee>98 %) d'autre part l'acétate (2,556 g, 14,5 mmol, rdt 43%, ee 98%).

Alcool **S-196** :

Rf : 0,4 (AcOEt/Cyclohexane : 4/6).

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'alcool racémique **rac-285**.

$$[\alpha]_D^{25} = -46 \text{ (c = 1,34 ; CHCl}_3\text{)}.$$

Acétate **R-197** :

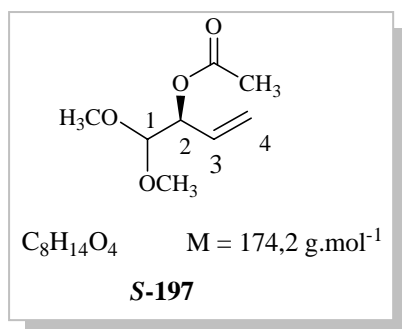
Rf : 0,6 (AcOEt/Cyclohexane : 2/8).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,84 (m, 1H, H_2) ; 5,31 (m, 1H, H_3) ; 5,29 (dd, 1H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 10,6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1-\text{H}_1'} = 7,3 \text{ Hz}$) ; 4,28 (d, 1H, $\text{H}_{1'}$, $J_{\text{H}_{1'}-\text{H}_1} = 7,3 \text{ Hz}$) ; 3,38 (s, 3H, OH_3) ; 3,37 (s, 3H, OH_3) ; 2,08 (s, 1H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 169,8 (CO) ; 132 (C_2) ; 118,2 (C_3) ; 104,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 73 (C_1) ; 55,4-54,5 (OCH_3) ; 21 (CH_3).

$$[\alpha]_D^{25} = 31 \text{ (c = 1,29 ; CHCl}_3\text{)}.$$

(S)-acétate de 1,1-diméthoxybut-3-èn-2-yle S-197



A une solution de l'alcool **S-196** (1,3 g, 9,84 mmol, 1 éq), dans 25 mL de CH_2Cl_2 , on ajoute de la triéthylamine (3,8 mL, 29,53 mmol, 3 éq) et de l'anhydride acétique (2,78 mL, 29,53 mmol, 3 éq). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures, avant d'être évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : pentane/éther : 7/3). On isole une huile incolore (1,32 g).

Rendement = 77 %.

Rf = 0,41 (pentane/ éther : 7/3).

Les spectres de RMN du 1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'énantiomère **R-197**.

$[\alpha]_D^{25} = -30$ ($c = 1,3$; $CHCl_3$).

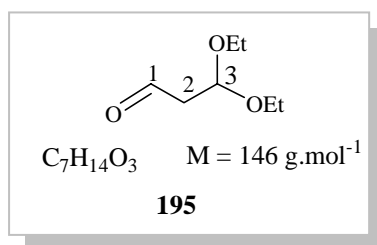
III.2. Ozonolyse

III.2.1. Protocole général

Une solution d'alcène (1 mmol) dans 2 mL de CH_2Cl_2 sous agitation, est refroidie à -78°C . L'ozone est mis à barboter jusqu'à ce que la solution devienne bleue (ce qu'indique un excès d'ozone en solution). Le courant d'ozone est alors remplacé par un courant d'argon pour éliminer l'excès d'ozone (la solution redevient incolore). La triphénylphosphine (1,1 mmol) est ajoutée et l'ensemble est agité pendant 12 heures, avant d'être évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : pentane/éther, les proportions varient en fonction de la polarité de chaque produit).

III.2.2. Synthèses des aldéhydes

3,3-diéthoxypropanal **195**



La synthèse de l'aldéhyde **195** a été réalisée selon le protocole général d'oxydation par ozonolyse à partir de l'alcène **194** (6 g, 41,6 mmol, 1 éq), dans 50 mL d'un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4/1). Après réduction par la triphénylphosphine (12 g, 45,8 mmol, 1,1 éq), le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant pentane/éther: 6/4). On obtient 4,72 g d'une huile incolore.

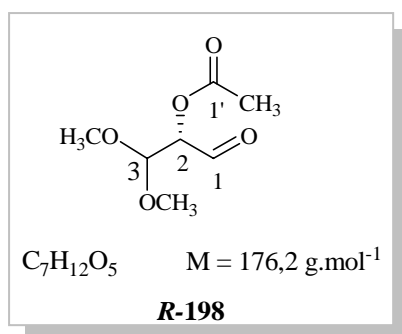
Rendement = 78%.

Rf = 0,64 (cyclohexane/ AcOEt: 4/6).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 9,40 (s, 1H, H_1) ; 4,93 (t, 1H, H_3 , $J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 7 \text{ Hz}$) ; 3,65 (m, 2H, OCH_2) ; 3,52 (m, 2H, OCH_2) ; 2,70 (dd, 2H, H_2 , $J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_2-\text{H}_1} = 6 \text{ Hz}$) ; 1,19 (t, 6H, CH_3 , $J = 7 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ : 199,1 (C_1) ; 98,0 (C_3) ; 61,3 (2OCH_2) ; 47,3 (C_2) ; 14,5 (2CH_3).

(2*R*)-2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal *R*-198



Selon le protocole général d'oxydation par ozonolyse, la synthèse de l'aldéhyde ***R*-198** a été réalisée à partir de l'alcène ***R*-197** (3 g, 17,03 mmol, 1 éq), dans 40 mL de CH_2Cl_2 . Après réduction par (4,88 g, 18,73 mmol, 1,1 éq) la triphénylphosphine, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : pentane/éther : 2/8). On isole une huile incolore (2,40 g).

Rendement = 79 %.

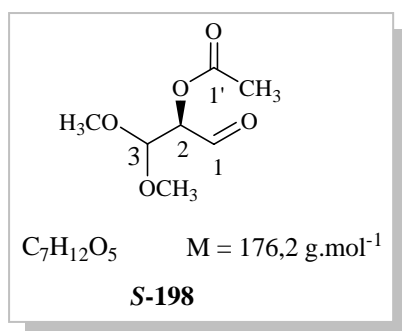
Rf = 0,35 (pentane/ éther : 2/8).

$[\alpha]_D^{25} = 32$ ($c = 1,04$, $CHCl_3$).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9,6 (d, $J_{H1-H2} = 2,2$ Hz, 1H, H_1) , 5,2 (dd, , 1H, H_3 $J_{H3-H2} = 4,9$ Hz, $J_{H3A-H3B} = 2,2$ Hz), 4,6 (dd, 1H, H_2 , $J_{H2-H3} = 4,9$ Hz, $J_{H2-H3} = 2,2$ Hz), 3,47-3,46 (s, 6H, OCH_3), 2,2 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 195,6 (C_1), 169,8 ($C_{1'}$), 102,7 (C_3), 77 (C_2), 56-54,9 (OCH_3), 20, 5 (CH_3).

(2*S*)-2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal *S*-198



L'aldéhyde **S-198** a été obtenu selon le protocole général d'oxydation par ozonolyse à partir de l'alcène **S-197** (1,3 g, 7,46 mmol, 1 éq), dans 20 mL de CH_2Cl_2 . Après réduction par (3,2 g, 8,20 mmol, 1,1 éq) la triphénylphosphine. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : pentane/éther : 2/8). On isole une huile incolore (1,07 g).

Rendement = 81%.

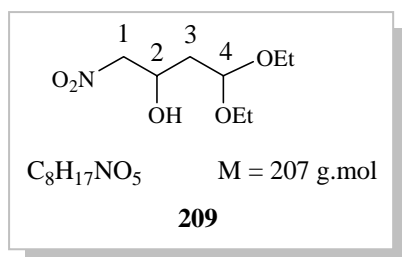
$[\alpha]_D^{25} = -39$ ($c = 1,1$; $CHCl_3$).

Rf = 0,35 (pentane/ éther : 2/8).

Les spectres de RMN du 1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'énantiomère **R-230**.

IV. Synthèse des nitroacétals

4,4-diéthoxy-1-nitrobutan-2-ol rac-209



A une solution de **195** (2 g, 13,7 mmol, 1 éq) et de nitrométhane (750 μL , 13,7 mmol, 1 éq) dans 3 mL de MeOH sous forte agitation, est ajoutée une solution de NaOH (10M) (1370 μL , 13,7 mmol, 1 éq) à 0°C. Une fois l'addition terminée, le mélange est agité à 0°C pendant 45 minutes. On ajoute de l'acide acétique (785 μL , 1,7 mmol, 1 éq). Le milieu est extrait par 2 x 200 mL d'éther, séché sur MgSO_4 et concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 6/4). On obtient 2,44 g d'une huile légèrement jaune.

Rendement = 86%.

Rf = 0,42 (cyclohexane/ AcOEt: 6/4).

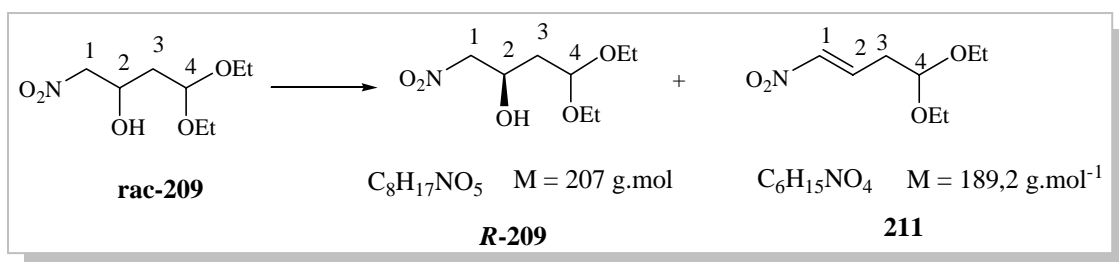
IR (pur) ν : (cm^{-1}) 3435 (OH) ; 1550 (NO) ; 1376 (CN) ; 1125 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,74 (t, 1H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3} = 5 \text{ Hz}$) ; 4,57 (m; 1H, H_2) ; 4,45 (dd, 2H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_1'} = 7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 2,3 \text{ Hz}$) ; 3,72 (m, 2H, OCH_2) ; 3,58 (m, 2H, OCH_2) ; 1,88 (m, 2H, H_3) ; 1,22 (m, 6H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 101,3 (C_4) ; 80,4 (C_1) ; 65,8 (C_2) ; 62,8-62,5 (CH_2) ; 37,2 (C_3) ; 15,2 (CH_3).

SM (IC): m/z 206 ($\text{M}-\text{H}^+$) ; 190 [$\text{M}-\text{OH}$] ; 162 [$\text{M}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$] ; 144 ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_3^+ = 162-\text{H}_2\text{O}$) ; 103 ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2^+$).

Dédoublément cinétique du composé 209



L'alcool **rac-209** (500 mg, 1,91 mmol, 1 éq) et le butyrate de vinyle (500 μL , 3,94 mmol, 2,06 éq) sont dissous dans du diisopropyle d'éther (DIPE) (20 mL) et la lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435, 2g) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 48 heures à température ambiante. La réaction, suivie par HPLC chirale et CCM, est stoppée par filtration. Le solvant est évaporé et le mélange est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 80/20). On isole d'une part l'alcène (190 mg) et d'autre part l'alcool (245 mg, ee 92%).

Alcène : Rendement = 41 %.

Alcool : Rendement = 49 %.

L'alcool R-209

R_f = 0,42 (cyclohexane/ AcOEt : 6/4).

$[\alpha]_D^{25} = -10$ (c = 1,22 ; CHCl_3).

Les données spectroscopiques sont identiques à celles obtenues pour l'alcool **rac-209**.

L'alcène 211

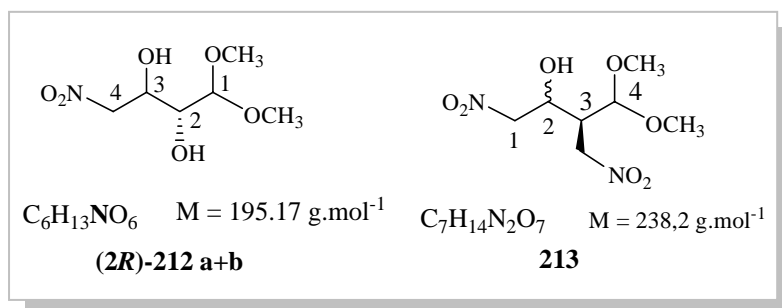
R_f = 0,54 (cyclohexane/ AcOEt : 7/3).

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 1652 (C=C) ; 1527 (NO) ; 1350 (CN) ; 1122-1061 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,17 (m, 1H, H_2) ; 6,96 (d, 1H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 14 \text{ Hz}$) ; 4,53 (t, 2H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3} = 5,3 \text{ Hz}$) ; 3,62-3,43 (m, 4H, OCH_2) ; 2,51 (dd, 2H, H_3 , $J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 5,3 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 5,4$) ; 1,16 (t, 6H, H_6 , $J = 7,2 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 141,1 (C_2) ; 137,3 (C_1) ; 100,5 (C_4) ; 62,5-59,9 (C_5) ; 33,2 (C_3) ; 15,2 (H_6).

(2R)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol (2R)-229 a+b



En appliquant le même protocole que pour la formation de **rac-209**, on part du composé **R-198** (1 g, 5,67 mmol, 1 éq), d'une solution de NaOH (6M) (940 μL , 5,67 mmol, 1 éq) et du nitrométhane (306 μL , 5,67 mmol, 1 éq). On isole deux produits : le produit de l'alkylation **(2R)-212 a+b** sous forme d'un mélange de deux diastéréosomères dans les proportions 50/50, avec un rendement de 56% et le composé **213**, produit de la substitution nucléophile sur la fonction ester avec un rendement de 10 %.

Nous avons réalisé la synthèse selon un autre protocole. Il consiste à préparer le nitronate dans le méthanol à 0°C avant de l'ajouter goutte à goutte sur la solution d'aldéhyde **R-198** à 0°C. Ainsi, seul le produit d'alkylation **212** est formé.

Rendement = 61 %.

Composés (2R)-212a+b :

Rf = 0,47 (cyclohexane/ AcOEt: 2/8).

$[\alpha]_D^{25} = -7$ (c = 1,1 ; CHCl_3) (mélange **(2R)-212a** et **b**).

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3434 (CH, OH); 1527 (NO); 1380 (CN); 1196-1076 (CO).

Diastéréoisomère a :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,52 (ddd, 1H, H_1 , $J_{H_1-H_1'} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{H_1-H_2} = 7 \text{ Hz}$, $J_{H_1-H_3} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 4,50 (ddd, 1H, $H_{1'}$, $J_{H_{1'}-H_1} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{H_{1'}-H_2} = 7 \text{ Hz}$, $J_{H_{1'}-H_3} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 4,41 (m; 1H, H_2) ; 4,39 (dd, 1H, H_4 , $J_{H_4-H_3} = 5,9 \text{ Hz}$, $J_{H_4-H_2} = 2,3 \text{ Hz}$) ; 3,6 (dd, 1H, H_3 , $J_{H_3-H_2} = 10 \text{ Hz}$, $J_{H_3-H_4} = 5,9 \text{ Hz}$) ; 3,45 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 104,8 (C_4) ; 76,7 (C_1) ; 71,2 (C_3) ; 69,25 (C_2) ; 55,4 (CH_3).

Diastéréoisomère b :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,46 (ddd, 1H, H_1 , $J_{H_1-H_1'} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{H_1-H_2} = 7 \text{ Hz}$, $J_{H_1-H_3} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 4,44 (ddd, 1H, $H_{1'}$, $J_{H_{1'}-H_1} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{H_{1'}-H_2} = 7 \text{ Hz}$, $J_{H_{1'}-H_3} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 4,44 (m, 1H, H_2) ; 4,4 (dd, 1H, H_4 , $J_{H_4-H_3} = 5,8 \text{ Hz}$, $J_{H_4-H_2} = 2,3 \text{ Hz}$) ; 3,46 (dd, 1H, H_3 , $J_{H_3-H_2} = 10 \text{ Hz}$, $J_{H_3-H_4} = 5,9,2 \text{ Hz}$) ; 3,44 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 104,8 (C_4) ; 77,9 (C_1) ; 69,2 (C_3) ; 67,8 (C_2) ; 56,7 (CH_3).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+Na]^+$: masse théorique = 218,0641
masse trouvée = 218,0632

Composé 213 :

Rf = 0,57 (cyclohexane/ AcOEt : 2/8).

$[\alpha]_D^{25} = -12,6$ (c = 1,25 ; CHCl₃).

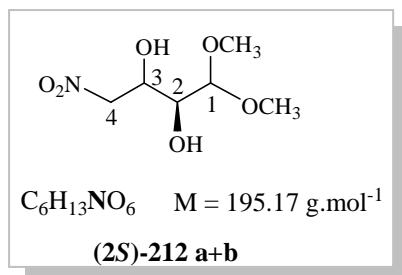
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3532 (CH, OH) ; 1558 (NO) ; 1382 (CN) ; 1197-1073 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 4,76 (ddd, 1H, H_{1'}A, J_{H1'A-H1'B} = 17,2 Hz, J_{2H1'A-H3} = 10,5 Hz, J_{H1'A-H2} = 6,4 Hz) ; 4,75 (ddd, 1H, H_{1'}B, J_{H1'B-H1'A} = 17,2 Hz, J_{2H1'B-H3} = 10,5 Hz, J_{H1'B-H2} = 6,4 Hz) ; 4,6 (ddd, 1H, H_{1A}, J_{HA-HB} = 17,8 Hz, J_{HA-H2} = 13,4 Hz, J_{HA-H3} = 6,8 Hz) ; 4,58 (ddd, 1H, H_{1B}, J_{HB-HA} = 17,8 Hz, J_{HB-H2} = 13,4 Hz, J_{HB-H3} = 6,8 Hz) ; 4,32 (d; 1H, H₄, J_{H4-H3} = 5,6 Hz) ; 3,78 (m, 1H, H₂) ; 3,45 (s, 3H, CH₃) ; 3,44 (s, 3H, CH₃) ; 3,3 (m, 1H, H₃).

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ : 105,1 (C₄) ; 74,3 (C₁) ; 72,9 (C_{1'}) ; 69,6 (C₂) ; 55,8-55,6 (CH₃) ; 37,6 (C₃).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+Na]^+$: masse théorique = 261,0699
masse trouvée = 261,0718

(2S)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol (2S)-212a+b



La synthèse est réalisée comme précédemment et selon le deuxième protocole en prenant 1,22 g de l'aldéhyde **S-198** (6,87 mmol, 1 éq), 372 μL de nitrométhane (6,87 mmol, 1 éq) et 1,14 mL (6,87 mmol, 1 éq) d'une solution NaOH (6 M). Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 2/8). On obtient 788 mg d'une huile légèrement jaune sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères dans les proportions 50/50.

Rendement = 58 %.

Rf = 0,52 (cyclohexane/ AcOEt : 2/8).

$[\alpha]_D^{25} = 20$ ($c = 1,05$, CHCl_3) (mélange de **(2S)-212a** et **b**).

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3434 (CH, OH); 1527 (NO); 1380 (CN); 1196-1076 (CO).

Diastéréoisomère a :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,64 (ddd, 1H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_1'} = 13,5 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 10,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1-\text{H}_3} = 2,6 \text{ Hz}$) ; 4,63 (ddd, 1H, H_1' , $J_{\text{H}_1'-\text{H}_1} = 13,5 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1'-\text{H}_2} = 10,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1'-\text{H}_3} = 2,6 \text{ Hz}$) ; 4,50 (m, 1H, H_2) ; 4,43 (dd, 1H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3} = 5,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_4-\text{H}_2} = 2,7 \text{ Hz}$) ; 3,67 (dd, 1H, H_3 , $J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 12 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 5,8 \text{ Hz}$) ; 3,48 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 104,6 (C_4) ; 78 (C_1) ; 71,4 (C_3) ; 70,2 (C_2) ; 55,5-55,2 (CH_3).

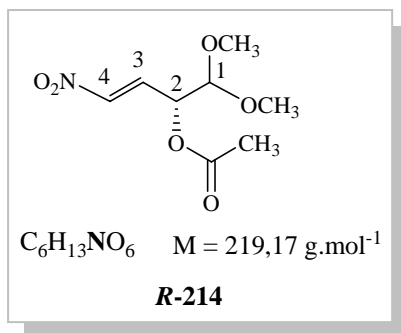
Diastéréoisomère b :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,56 (ddd, 1H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_1'} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1-\text{H}_3} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 4,55 (ddd, 1H, H_1' , $J_{\text{H}_1'-\text{H}_1} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1'-\text{H}_2} = 7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1'-\text{H}_3} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 4,46 (m, 1H, H_2) ; 4,42 (dd, 1H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3} = 5,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_4-\text{H}_2} = 2,7 \text{ Hz}$) ; 3,52 (dd, 1H, H_3 , $J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 10 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 6,2 \text{ Hz}$) ; 3,47 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 104,8 (C_4) ; 78,5 (C_1) ; 69,2 (C_3) ; 67,9 (C_2) ; 56,5-56,2 (CH_3).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$: masse théorique = 218,0641
masse trouvée = 218,0632

(R)-acétate de 1-(1,1-diméthoxyméthyl)-3-nitropro-2-ène-1-yle R-214



L'acétal **R-212** (300 mg, 1,53 mmol, 1 éq) est dissous dans l'éther (8 mL) en présence de DMAP (7 mg, 0,06 mmol, 0,04 éq). On ajoute l'anhydride acétique (290 μ L, 3,06 mmol, 2 éq) et on agite à température ambiante pendant 2 heures. Le produit est utilisé directement dans l'étape suivante sans aucune purification.

Pour sa caractérisation, il est purifié par chromatographie éclair :

Rendement : 82%.

Rf = 0,66 (cyclohexane/ AcOEt : 3/7).

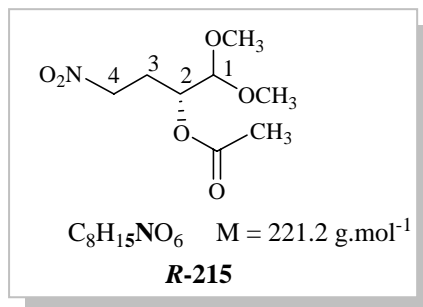
$[\alpha]_D^{25} = 21$ ($c = 1$, $CHCl_3$).

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 1650 (C=C) ; 1550 (NO) ; 1376 (CN) ; 1125 (CO).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,02 (dd, 1H, H_3 , $J_{H_3-H_4} = 13,5 \text{ Hz}$, $J_{H_3-H_2} = 4,7 \text{ Hz}$) ; 6,86 (dd; 1H, H_4 , $J_{H_4-H_3} = 13,5 \text{ Hz}$, $J_{H_4-H_2} = 1,4 \text{ Hz}$) ; 5,37 (m, 1H, H_2) ; 4,21 (d, 1H, H_1 , $J = 5 \text{ Hz}$) ; 3,24- 3,22 (s, 6H, OCH_3) ; 1,95 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ : 169,3 (CO) ; 140,9 (C_3) ; 135,9 (C_4) ; 104 (C_1) ; 69,2 (C_2) ; 56,3-54,9 (OCH_3) ; 20,6 (CH_3).

Acétate de (*R*)-1-(1,1-diméthoxyméthyl)-3-nitroprop-1-yle *R*-215



A la solution précédente du produit ***R*-214** on ajoute 10 mL de méthanol. Le milieu est refroidi à 0°C, puis on additionne NaBH_4 par petites portions (290 mg, 7,65 mmol, 5 éq). Une fois l'addition terminée, on agite 3 heures à température ambiante. Le milieu est neutralisé par 10 mL de NH_4Cl saturé puis extrait avec de l'éther ($3 \times 100 \text{ mL}$). La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant cyclohexane/ AcOEt : 6/4). On obtient 214 mg d'une huile incolore.

Rendement = 70% à partir du produit ***R*-212**.

Rf = 0,61 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

$[\alpha]_D^{25} = 16,5$ ($c = 1$, CHCl_3).

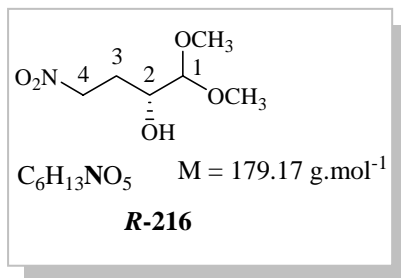
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 2943 (CH) ; 1740 (C=O) ; 1557 (NO) ; 1374-1237 (CN) ; 1080 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,9 (ddd, 1H, H_2 , $J_{\text{H}_2-\text{H}_{3a}} = J_{\text{H}_2-\text{H}_{3b}} = 4,5 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_2-\text{H}_1} = 3,7 \text{ Hz}$) ; 4,4 (t; 2H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3} = 7,2 \text{ Hz}$) ; 4,27 (d, 1H, H_1) ; 3,36-3,33 (s, 6H, OCH_3) ; 2,39 (ddd, 1H, H_{3a} , $J_{\text{H}_{3a}-\text{H}_{3b}} = 8,8$, $J_{\text{H}_{3a}-\text{H}_2} = 8,1 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{3a}-\text{H}_4} = 7,2 \text{ Hz}$) ; 2,31 (ddd, 1H, H_{3b} , $J_{\text{H}_{3b}-\text{H}_{3a}} = 8,8$, $J_{\text{H}_{3b}-\text{H}_2} = 8,1 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{3b}-\text{H}_4} = 7,2 \text{ Hz}$) ; 2,02 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 170,2 (CO) ; 104,2 (C_1) ; 71,9 (C_4) ; 69,8 (C_2) ; 56,1-54,1 (OCH_3) ; 26,5 (C_3) ; 14,2 (CH_3).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$: masse théorique = 244,0797
masse trouvée = 244,0804

(R)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2-ol R-216



L'ester **R-215** (214 mg, 1,38 mmol, 1 éq) est dissous dans 10 mL de méthanol. On ajoute une solution de NaOH (1 M) (1,65 mL, 1,65 mmol, 1,2 éq). Le milieu est agité à température ambiante pendant 45 minutes. On extrait 3 fois avec de l'éther (150 mL) et on sèche sur MgSO_4 avant de concentrer sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle : 5/5). On obtient 183 mg d'une huile incolore.

Rendement = 77 %

Rf = 0,28 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

$[\alpha]_D^{25} = 22$ ($c = 0,7$; CHCl_3).

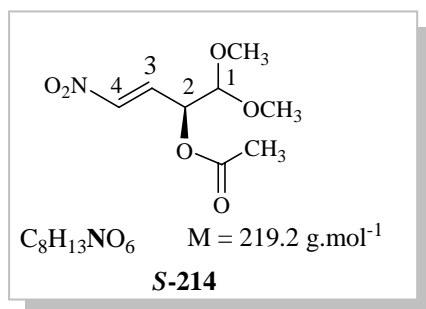
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3460 (OH) ; 1555 (NO) ; 1382 (CN) ; 1028 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,9 (ddd, 1H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3\text{A}} = J_{\text{H}_4-\text{H}_3\text{B}} = 6,9 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_4-\text{H}_2} = 3,3 \text{ Hz}$) ; 4,1 (d; 2H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 6 \text{ Hz}$) ; 3,63 (m, 1H, H_2) ; 3,39-3,37 (s, 6H, OCH_3) ; 2,29 (m, 1H, H_3) ; 2,98 (m, 1H, H_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 106,3 (C_1) ; 72,1 (C_4) ; 68,2 (C_2) ; 55,4-55,3 (OCH_3) ; 29,2 (C_3).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$: masse théorique = 202,0691
masse trouvée = 202,0701

Acétate de (S)-1-(1,1-diméthoxyméthyl)-3-nitropro-2-èn-1-yle S-214



L'acétal **S-212** (200 mg, 1,02 mmol, 1 éq) est dissous dans l'éther (8 mL) en présence de DMAP (5 mg, 0,043 mmol, 0,04 éq). On ajoute l'anhydride acétique (194 μL , 2,04 mmol, 2 éq) et on agite à température ambiante pendant 2 heures. Le produit n'est pas isolé et utilisé directement dans l'étape suivante.

Pour sa caractérisation, il est purifié par chromatographie éclair :

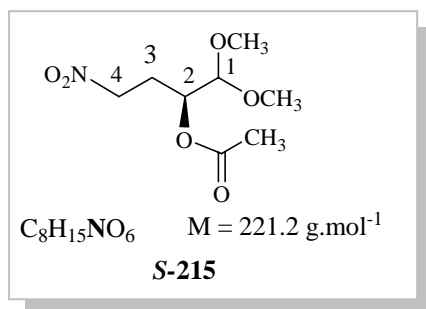
Rendement = 83%.

Rf = 0,66 (cyclohexane/ AcOEt : 3/7).

$[\alpha]_D^{25} = -11$ ($c = 0,7$, CHCl_3).

Les données spectroscopiques sont identiques à celles obtenues pour l'énantiomère **R-214**.

Acétate de (S)-1-(1,1-diméthoxyméthyl)-3-nitroprop-1-yle *S*-215



A la solution précédente de l'alcène **S-214** on ajoute 10 mL de méthanol. Le milieu est refroidi à 0°C puis on additionne NaBH_4 par petites portions (290 mg, 7,65 mmol, 5,1 éq). Une fois l'addition terminée, on agite 3 heures à température ambiante. Le milieu est neutralisé par 10 mL de NH_4Cl saturé puis extrait avec de l'éther (3×100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée. On obtient 214 mg d'une huile incolore.

Rendement = 70%.

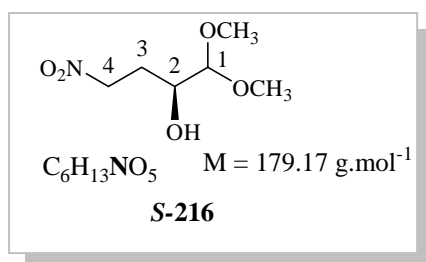
Rf = 0,61 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

$[\alpha]_D^{25} = -15$ ($c = 1,1$, CHCl_3).

Les données spectroscopiques sont identiques à celles obtenues pour l'énantiomère **R-215**.

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$: masse théorique = 244,0797
masse trouvée = 244,0804

(2S)-1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2-ol 216-S



L'ester **S-215** (214 mg, 1,38 mmol, 1 éq) est dissous dans 10 mL de méthanol. On ajoute une solution de NaOH (1 M) (1,65 mL, 1,65 mmol, 1,2 éq). Le milieu est agité à température ambiante pendant 45 minutes. On extrait 3 fois avec de l'éther (150 mL) et on sèche sur $MgSO_4$ avant de concentrer sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle : 5/5). On obtient 183 mg d'une huile incolore.

Rendement = 77%.

Rf = 0,28 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

$[\alpha]_D^{25} = -28$ ($c = 0,9$; $CHCl_3$).

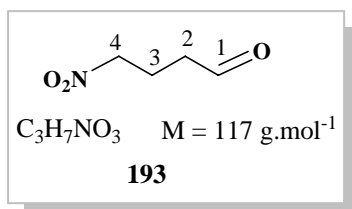
Les données spectroscopiques sont identiques à celles obtenues pour l'énantiomère **R-216**.

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+Na]^+$: masse théorique = 202,0691
masse trouvée = 202,0701

V. Synthèse des nitroaldéhydes

V.1. Synthèse du 4-nitrobutanal

4-nitrobutanal 193



A une solution de nitrométhane (200 mL, 3,7 mol, 50 éq) et de fluorure de potassium KF (13,83 g, 231,6 mmol, 3,1 éq) préalablement dissous dans 100 mL de méthanol à -35°C est ajoutée une solution d'acroléine (5 mL, 74 mmol; 1 éq) dans 25 mL de méthanol (25-30 min) sous agitation. Le mélange est agité à -35°C pendant 1h30. Le milieu est repris par 500 mL d'acétate d'éthyle, lavé par 2×200 mL d'eau et 200 mL de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par distillation sous pression réduite à 0,1 mmHg (100°C). On obtient 4,2 g d'une huile incolore

Rendement = 48 %.

Rf = 0,42 (cyclohexane/ AcOEt: 6/4).

RMN 1H (400 MHz; $CDCl_3$) δ : 9,8 (s, 1H, H_1) ; 4,41 (t, 2H, H_4) ; 2,69 (t, 2H, H_2) ; 2,22 (m, 2H, H_3).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ : 199,7 (C_1) ; 74,3 (C_4) ; 34 (C_2) ; 19,6 (C_3).

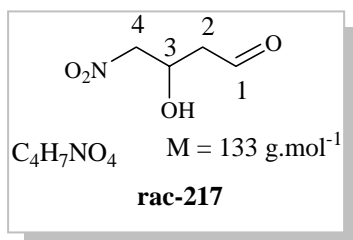
V.2. Synthèse des nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés

V.2.1. Protocole Général

Le nitroacétal (1 mmol) est dissous dans 2 mL d'eau, on ajoute de la résine acide (Dowex 50x8, 1 g). La solution est agitée 2h30 à 45°C. La résine est éliminée par filtration, le pH est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (1M). Le produit n'est pas isolé et directement utilisé dans les réactions avec l'aldolase.

V.2.2. Nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés

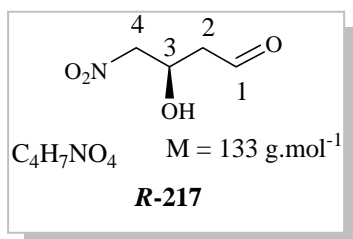
3-hydroxy-4-nitrobutanal **rac-217**



En suivant le protocole général, au produit **rac-209** (400 mg, 2,65 mmol) dans 5 mL d'eau, on ajoute de la résine acide (Dowex 50x8, 1,5 g). La réaction est totale d'après la CCM et le rendement est supposé quantitatif.

Rf = 0,29 (cyclohexane/ AcOEt: 4/6).

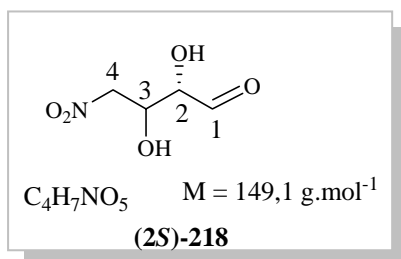
(*R*)-3-hydroxy-4-nitrobutanal **R-217**



Dans les mêmes conditions, la synthèse de l'énantiomère **R-217** a été réalisée à partir de l'acétal **R-209** (300 mg, 1,98 mmol) dans 4 mL d'eau et de la résine acide (Dowex 50x8, 1,12 g). La réaction est totale d'après la CCM et le rendement est supposé quantitatif.

Rf = 0,29 (cyclohexane/ AcOEt: 4/6).

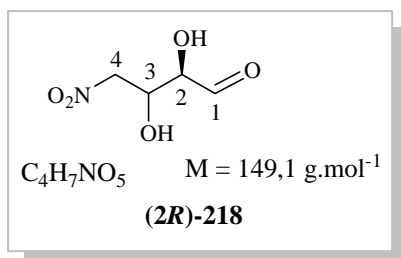
(2S)-2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal (2S)-218



Le mélange des diastéréoisomères **(2S)-212a** et **b** (270 mg, 1,38 mmol) a été hydrolysé selon le protocole général de la déprotection, dans 2,5 mL d'eau et en présence de la résine acide (Dowex 50x8, 0,8 g). La réaction est totale d'après la CCM et le rendement est supposé quantitatif.

R_f = 0,14 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

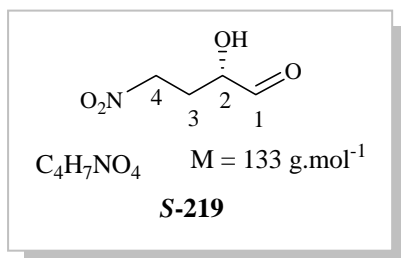
(2R)-2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal (2R)-218



Selon le protocole général de la déprotection, **(2R)-212a** et **b** (300 mg, 1,53 mmol) est hydrolysé dans 3 mL d'eau en présence de la résine acide (Dowex 50x8, 0,9 g). La réaction est totale d'après la CCM et le rendement est supposé quantitatif.

R_f = 0,14 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

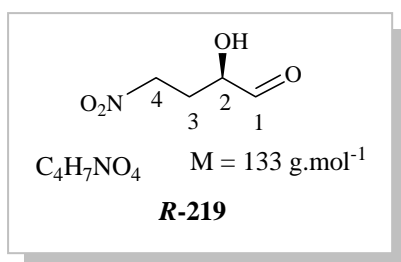
(S)-2-hydroxy-4-nitrobutan-2-ol S-219



L'aldéhyde **S-219** a été obtenu selon le protocole général, à partir de l'acétal **S-216** (240 mg, 1.34 mmol) dans 2,5 mL d'eau en présence de la résine acide (Dowex 50x8, 0,75 g). La réaction est totale d'après la CCM et le rendement est supposé quantitatif.

Rf = 0,2 (cyclohexane/ AcOEt: 5/5).

(R)-2-hydroxy-4-nitrobutan-2-ol R-219



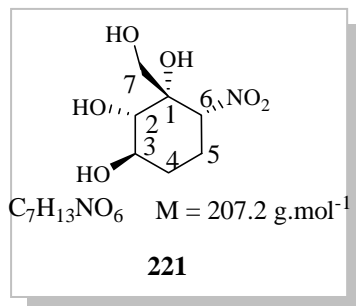
Suivant le protocole général et à partir de l'acétal **R-216** (110 mg, 0.61 mmol) dans 1,5 mL d'eau en présence de la résine acide (Dowex 50x8, 0,34 g), l'aldéhyde **R-219** a été obtenu. La réaction est totale d'après la CCM et le rendement est supposé quantitatif.

Rf = 0,2 (cyclohexane/ AcOEt : 5/5).

VI. Synthèse des nitrocyclitols

VI.1. A partir du 4-nitrobutanal

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 6*R*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexan-1,2,3-triol **221**



Dans un ballon, on introduit l'aldéhyde **193** (400 mg, 3,4 mmol, 1,4 éq), 3 mL de DMSO et 5,31 mL de DHAP (2,2 mmol, 1 éq) dans 30 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH 1M. Après dégazage de la solution avec de l'argon, l'aldolase (RAMA 105 U, 620 µL) centrifugée est additionnée. Au bout de 24 heures, le milieu réactionnel est extrait avec 3 × 20 mL d'AcOEt. Le pH de la phase aqueuse est ajusté à 3,9 avec HCl (1M), la phytase acide (150 U) est additionnée et le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. On concentre la solution sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (CH₂Cl₂ / MeOH : 95/5 à 80/20). On obtient 287 mg d'un solide légèrement jaune.

Temps (heures)	0	2	3	8	24
DHAP restant en (%) dans le milieu réactionnel	100	29	17	14	0

Rendement = 69 % (par rapport au DHAP).

R_f = 0,16 (CH₂Cl₂ / MeOH : 85/15) (rév : solution de KMnO₄).

P_f = 134°C

$[\alpha]_D^{25} = 21$ (c = 1,2, CH₃OH).

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3367 (OH) ; 2495 (CH) ; 1553 (NO).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ : 4,82 (dd, 1H, H₆, J_{H6ax-H5eq} = 4, J_{H6ax-H1ax} = 12,9) ; 3,85 (d, 1H, H_{7a}, J_{H7a-H7b} = 10) ; 3,75 (ddd, 1H, H₃, J_{H3ax-H4ax} = 10,9, J_{H3ax-H2ax} = 9,5, J_{H3ax-H4eq} = 4,7) ; 3,37 (d, 1H, H₂, J_{H2ax-H3ax} = 9,2) ; 3,34 (d, 1H, H_{7b}, J_{H7a-H7b} = 10) ; 2,46 (dddd, 1H, H_{5ax}, J_{H5ax-H6ax} = 12,8, J_{H5ax-H4eq} = 3,3, J_{H5ax-H5eq} = 16) ; 2,04 (m, 1H, H_{5eq}) ; 2,01 (m, 1H, H_{4eq}) ; 1,35 (dddd, 1H, H_{4ax}, J_{H4ax-H4eq} = 14,4, J_{H4ax-H5ax} = 13,1, J_{H4ax-H3ax} = 11,2, J_{H4ax-H5eq} = 3).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 87,2 (C_6) ; 78 (C_1) ; 75,7 (C_2) ; 71,4 (C_3) ; 62,4 (C_7) ; 30,3 (C_1) ; 25,4 (C_4).

SM (IC) : m/z : 208 $[(\text{M}+\text{H})^+]$; 190 $[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})^+]$.

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$: masse théorique = 230,0641
masse trouvée = 230,0640

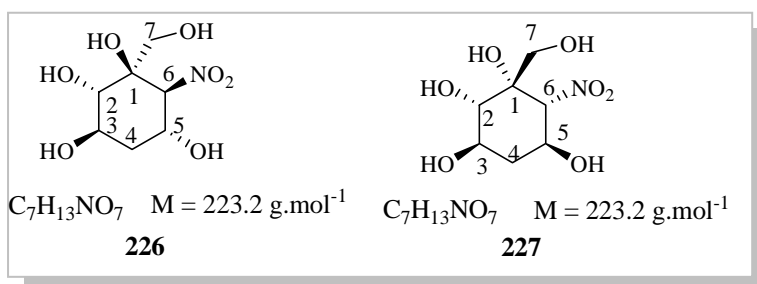
VI.2. A partir des aldéhydes α et/ou β hydroxylés

VI.2.1. Protocole général

Le nitroaldéhyde (1 mmol) en solution dans l'eau et une solution de DHAP (0,83 mmol) sont mélangés dans 10 mL d'eau. Le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (1M). Après dégazage de la solution avec de l'argon, l'aldolase (RAMA 40 U) centrifugée est additionnée. Au bout de 24 heures, le milieu réactionnel est extrait avec 3×20 mL d'AcOEt. Le pH de la phase aqueuse est ajusté à 3,9 avec HCl (1M), la phytase acide (56 U) est additionnée et le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. On concentre la solution sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (éluant : CH_2Cl_2 /MeOH : les proportions sont en fonction de la polarité de chaque nitrocyclitol).

VI.2.2. Synthèse

(1*R*, 2*S*, 3*R*, 5*R*, 6*S*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexan-1,2,3,5-tétraol 226
et **(1*S*, 2*S*, 3*R*, 5*S*, 6*R*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexan-1,2,3,5-tétraol 227**



La synthèse des nitrocyclitols **226** et **227** a été réalisée selon le protocole général, à partir de l'aldéhyde **rac-217** (1,93 mmol), d'une solution de DHAP (1,61 mmol) dans 25 mL d'eau, de l'aldolase centrifugée (RAMA 77 U) et de la phytase acide (108 U). Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (éluant : CH_2Cl_2 /MeOH : 90/10 à 80/20). On isole 124 mg du composé **226** et 151 mg du composé **227** (proportion 45/55) sous la forme de solides légèrement jaunes.

Produit 226 :

Rendement = 28,8 % (par rapport au DHAP).

Rf = 0,36 (CH_2Cl_2 /MeOH : 85/15) (rév : solution de KMnO_4).

Pf = 136°C

$[\alpha]_D^{25} = -33$ ($c = 4,25$; CH_3OH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3481 (OH) ; 1544 (NO) ; 1378 (CN) ; 1063 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ : 4,67 (ddd, 1H, H_5 , $J_{\text{H}5-\text{H}4\text{ax}} = 11 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}5-\text{H}4\text{eq}} = 4 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}5-\text{H}6} = 11 \text{ Hz}$) ; 4,63 (d; 1H, H_6 , $J_{\text{H}6-\text{H}5} = 11 \text{ Hz}$) ; 4,03 (ddd, 1H, H_3 , $J_{\text{H}3-\text{H}2} = 3 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}3-\text{H}4\text{ax}} = 3 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}3-\text{H}4\text{eq}} = 4 \text{ Hz}$).

$H_{4\acute{e}q} = 3 \text{ Hz}$) ; 3,96 (d, 1H, H_2 , $J_{H_2-H_3} = 3 \text{ Hz}$) ; 3,77 (d, 1H, H_{7B} , $J_{H_{7B}-H_{7A}} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,42 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H_{7A}-H_{7B}} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 2,15 (ddd, 1H, $H_{4\acute{e}q}$, $J_{H_{4\acute{e}q}-H_3} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H_{4\acute{e}q}-H_5} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H_{4\acute{e}q}-H_{4ax}} = 13,5 \text{ Hz}$) ; 1,98 (ddd, 1H, H_{4ax} , $J_{H_{4ax}-H_3} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H_{4ax}-H_5} = 11 \text{ Hz}$, $J_{H_{4ax}-H_{4\acute{e}q}} = 13,5 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 93,5 (C_6) ; 78,4 (C_1) ; 72 (C_3) ; 70,3 (C_2) ; 65,4 (C_7) ; 64,9 (C_5) ; 36,4 (C_4).

SM (IC): m/z: 246 [$M+Na^+$] ; 228 [$M+Na^+-H_2O$].

Analyse élémentaire : $C_7H_{13}NO_7$ (223,2)

	C %	H %	N%
Calculé :	37,67	5,87	6,28
Trouvé :	37,01	5,88	5,95

Produit 227 :

Rendement = 35,2 % (par rapport au DHAP).

Rf = 0,18 (CH_2Cl_2 /MeOH : 85/15) (rév : solution de $KMnO_4$).

Pf = 153°C

$[\alpha]_D^{25} = 27$ (c = 2,67 ; CH_3OH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3481 (OH) ; 1545 (NO) ; 1378 (CN) ; 1064 (CO).

RMN 1H (400 MHz, MeOD) δ : 4,65 (d, 1H, H_6 , $J_{H_6-H_5} = 10,2 \text{ Hz}$) ; 4,5 (ddd; 1H, H_5 , $J_{H_5-H_6} = 10,2 \text{ Hz}$, $J_{H_5-H_{4\acute{e}q}} = 5,1 \text{ Hz}$, $J_{H_5-H_{4ax}} = 12 \text{ Hz}$) ; 3,8 (ddd, 1H, H_3 , $J_{H_3-H_2} = 9,3 \text{ Hz}$, $J_{H_3-H_{4ax}} = 12 \text{ Hz}$, $J_{H_3-H_{4\acute{e}q}} = 4,7 \text{ Hz}$) ; 3,78 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H_{7A}-H_{7B}} = 11 \text{ Hz}$) ; 3,4 (d, 1H, H_2 , $J_{H_2-H_3} = 9,3 \text{ Hz}$) ; 3,25 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H_{7A}-H_{7B}} = 11 \text{ Hz}$) ; 2,27 (ddd, 1H, $H_{4\acute{e}q}$, $J_{H_{4\acute{e}q}-H_3} = 4,7 \text{ Hz}$, $J_{H_{4\acute{e}q}-H_5} = 5,1 \text{ Hz}$, $J_{H_{4\acute{e}q}-H_{4ax}} = 12 \text{ Hz}$) ; 1,43 (ddd, 1H, H_{4ax} , $J_{H_{4ax}-H_3} = 12 \text{ Hz}$, $J_{H_{4ax}-H_5} = 12,2 \text{ Hz}$, $J_{H_{4ax}-H_{4\acute{e}q}} = 12 \text{ Hz}$).

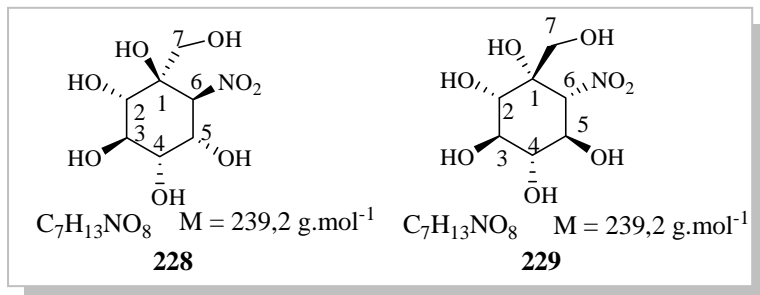
RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 93,3 (C_6) ; 76,6 (C_1) ; 75 (C_2) ; 69 (C_3) ; 66,7 (C_5) ; 62 (C_7) ; 39,1 (C_4).

SM (IC): m/z: 246 [$M+Na^+$] ; 228 [$M+Na^+-H_2O$].

Analyse élémentaire : $C_7H_{13}NO_7$ (223,2)

	C %	H %	N%
Calculé :	37,67	5,87	6,28
Trouvé :	37,66	5,87	6,28

(1*R*, 2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*S*, 6*S*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexan-1,2,3,4,5-pentaol 228.
et (1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*R*, 6*R*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexan-1,2,3,4,5-pentaol 229



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de l'aldéhyde (**2S**)-**218a+b** en solution dans l'eau (1,38 mmol), de DHAP (1,15 mmol), 55 U d'aldolase centrifugée et 77 U de la phytase. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 85/15 à 80/20). On obtient 45 mg du composé **228** et 73 mg du composé **229** sous la forme de solides légèrement jaunes.

Composé 228 :

Rendement = 16 % (par rapport au DHAP).

Rf = 0,32 (CH₂Cl₂/MeOH : 80/20) (rév : solution de KMnO₄).

Pf = 125°C

$$[\alpha]_D^{25} = -43 \text{ (c} = 0,8, \text{CH}_3\text{OH)}.$$

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3418 (OH) ; 1557 (NO) ; 1377 (CN) ; 1056 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ : 4,82 (d, 1H, H₆, J_{H6-H5} = 10 Hz) ; 4,52 (dd; 1H, H₅, J_{H5-H6} = 10 Hz, J_{H5-H4} = 3,5 Hz) ; 4 (dd, 1H, H₄, J_{H4-H5} = 3,5 Hz, J_{H4-H3} = 3,5 Hz) ; 3,97 (dd, 1H, H₃, J_{H3-H4} = 3,5 Hz, J_{H3-H2} = 3,5 Hz) ; 3,9 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 3,5) ; 3,74 (d, 1H, H_{7B}, J_{H7B-H7A} = 11 Hz) ; 3,37 (d, 1H, H_{7A}, J_{H7A-H7B} = 11 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 89,7 (C₆) ; 78,5 (C₁) ; 75,3 (C₄) ; 72,7 (C₂) ; 72,4 (C₃) ; 67,7 (C₅) ; 65,1 (C₇).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+Na]^+$: masse théorique = 262,0539
masse trouvée = 262,0540

Composé 229 :

Rendement = 25 % (par rapport au DHAP).

Rf = 0,24 (CH₂Cl₂/MeOH: 80/20) (rév : solution de KMnO₄).

$$[\alpha]_D^{25} = 9 \text{ (c = 0,8, CH}_3\text{OH)}.$$

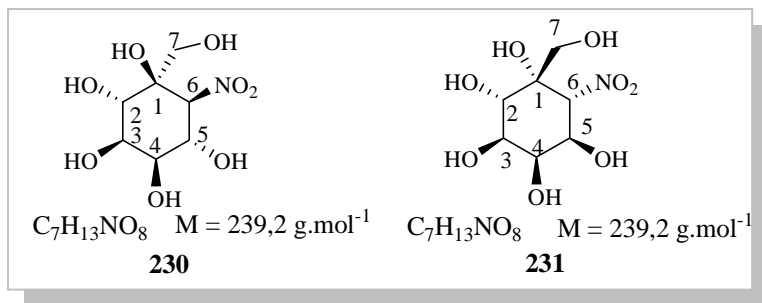
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3418 (OH) ; 1556 (NO) ; 1378 (CN) ; 1109 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ : 4,47 (d, 1H, H₆, J_{H6-H5} = 11 Hz) ; 4,05 (dd; 1H, H₅, J_{H5-H6} = 11 Hz, J_{H5-H4} = 9 Hz) ; 3,53 (d, 1H, H_{7B}, J_{H7B-H7A} = 11 Hz) ; 3,42 (dd, 1H, H₃, J_{H3-H4} = 10 Hz, J_{H3-H2} = 10 Hz) ; 3,26 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 10 Hz) ; 3,07 (dd, 1H, H₄, J_{H4-H5} = 9 Hz, J_{H4-H3} = 10 Hz) ; 3,03 (d, 1H, H_{7A}, J_{H7A-H7B} = 11 Hz).

RMN ¹³C (100MHz, MeOD) δ : 90,5 (C₆) ; 76,4 (C₁) ; 75,8 (C₄) ; 74,2 (C₃) ; 72,2 (C₂) ; 71,7 (C₅) ; 61,9 (C₇).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+Na]⁺ : masse théorique = 262,0539
masse trouvée = 262,0530

(1*R*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*, 6*S*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentaol 230
et (1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*R*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentaol 231.



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de l'aldéhyde (**3R**)-**218a+b** en solution dans l'eau (1,53 mmol), de DHAP (1,83 mmol), 61 U de l'aldolase et 86 U de la phytase. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (CH₂Cl₂ /MeOH : 85/15 à 80/20). On obtient 53 mg du composé **230** et 97 mg du composé **231** sous la forme de solides légèrement jaunes.

Composé 230 :

Rendement = 17 % (par rapport au DHAP).

Rf = 0,16 (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15).

Pf = 130°C

$$[\alpha]_D^{25} = -43 \text{ (c=0,8 ; CH}_3\text{OH)}.$$

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3418 (OH) ; 1556 (NO) ; 1377 (CN) ; 1057 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ : 4,65 (d, 1H, H₆, J_{H6-H5} = 10 Hz) ; 4,5 (dd; 1H, H₅, J_{H5-H6} = 10 Hz, J_{H5-H4} = 10 Hz) ; 4,1 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 4 Hz) ; 4,05 (dd, 1H, H₃, J_{H3-H4} = 4 Hz, J_{H3-H2} = 4 Hz) ; 3,82 (dd, 1H, H₄, J_{H4-H3} = 4 Hz, J_{H4-H5} = 10 Hz) ; 3,78 (d, 1H, H_{7B}, J_{H7B-H7A} = 11 Hz) ; 3,42 (d, 1H, H_{7A}, J_{H7A-H7B} = 11 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 92,2 (C_6) ; 78,2 (C_1) ; 75,2 (C_3) ; 72,6 (C_4) ; 70,9 (C_2) ; 69,5 (C_5) ; 65,2 (C_7).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+Na]^+$: masse théorique = 262,0539
masse trouvée = 262,0548

Composé 231 :

Rendement = 32% (par rapport au DHAP).

Rf = 0,11 (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15) (rév : KMnO₄).

Pf = 159°C

$$[\alpha]_D^{25} = 9 \text{ (c = 0,8, CH}_3\text{OH)}.$$

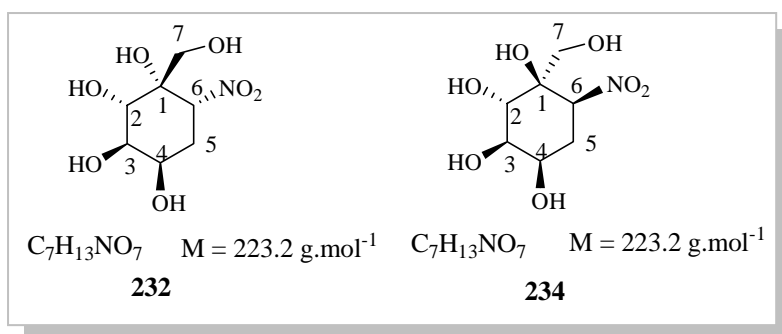
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3418 (OH) ; 1619 (NO) ; 1378 (CN) ; 1056 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ : 4,92 (d, 1H, H₆, J_{H6-H5} = 11 Hz) ; 4,34 (dd; 1H, H₅, J_{H5-H6} = 11, J_{H5-H4} = 3 Hz) ; 4 (dd, 1H, H₄, J_{H4-H5} = 3 Hz, J_{H4-H3} = 3 Hz) ; 3,95 (dd, 1H, H₃, J_{H3-H4} = 3 Hz, J_{H3-H2} = 10 Hz) ; 3,75 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 10 Hz) ; 3,65 (dd, 1H, H_{7B}, J_{H7B-H7A} = 11 Hz) ; 3,14 (d, 1H, H_{7A}, J_{H7A-H7B} = 11 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ : 89,2 (C₆) ; 76,1 (C₁) ; 73,3 (C₃) ; 71,7 (C₄) ; 69,8 (C₂) ; 69,3 (C₅) ; 62,1 (C₇).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+Na]⁺ : masse théorique = 262,0539
masse trouvée = 262,0530

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*R*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4-tétraol 232



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de l'aldéhyde **R-219** en solution dans l'eau (1,34 mmol), de DHAP (1,11 mmol), de l'aldolase 53 U et de la phytase (75 U). Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH : 80/20). On obtient 121 mg d'un solide légèrement jaune.

Rendement = 48 % (dont 6% de **234**).

Rf = 0,2 (CH_2Cl_2 / MeOH : 85/15) (rév : solution de $KMnO_4$).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3482 (OH) ; 1545 (NO) ; 1378 (CN) ; 1063 (CO).

Produit majoritaire 232

RMN¹H (400MHz, MeOD) δ : 5,12 (dd, 1H, H_6 , $J_{H6-H5ax} = 13,2 \text{ Hz}$, $J_{H6-H5eq} = 4,1 \text{ Hz}$) ; 4,3 (m, 1H, H_4) ; 4,06 (m, 1H, H_3) ; 3,85 (m, 1H, H_{7B}) ; 3,73 (m, 1H, H_2) ; 3,38 (m, 1H, H_{7A}) ; 2,47 (ddd, 1H, H_{5ax} , $J_{H5ax-H6} = J_{H5ax-H4} = 12,9 \text{ Hz}$, $J_{H5ax-H5eq} = 12,7 \text{ Hz}$) ; 2,23 (ddd, 1H, H_{5eq} , $J_{H5eq-H5ax} = 12,9 \text{ Hz}$, $J_{H5eq-H6} = 4,0 \text{ Hz}$, $J_{H5eq-H4} = 3,9 \text{ Hz}$).

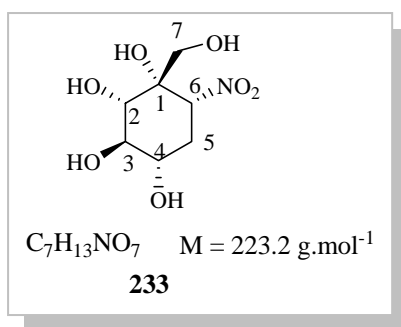
RMN¹³C (100 MHz, MeOD) δ : 82,9 (C_6) ; 78,9 (C_1) ; 73,4 (C_3) ; 70,1 (C_2) ; 68,6 (C_4) ; 61,9 (C_7) ; 32 (C_5).

Produit minoritaire 234

RMN¹H (400MHz, MeOD) δ : 5,03 (m, 1H, H_6) ; 4,71 (d, 1H, H_{7B} , $J_{H7B-H7A} = 11 \text{ Hz}$) ; 3,44 (dd, 1H, H_3 , $J_{H3-H2} = J_{H3-H4} = 9,3 \text{ Hz}$) ; 3,33 (m, 1H, H_4) ; 3,31 (d, 1H, H_2 , $J_{H2-H3} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,27 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H7A-H7B} = 11 \text{ Hz}$) ; 1,37 (ddd, 1H, H_{5ax} , $J_{H5ax-H6} = 11,8 \text{ Hz}$, $J_{H5ax-H5eq} = 13,2 \text{ Hz}$, $J_{H5ax-H4} = 12 \text{ Hz}$) ; 2,09 (ddd, 1H, H_{5eq} , $J_{H5eq-H5ax} = 13,2 \text{ Hz}$, $J_{H5eq-H6} = 4,2 \text{ Hz}$, $J_{H5eq-H4} = 4,1 \text{ Hz}$).

RMN¹³C (100 MHz, MeOD) δ : 83,5 (C_6) ; 77,2 (C_1) ; 71,6 (C_3) ; 69,8 (C_2) ; 68,3 (C_4) ; 66,8 (C_7) ; 32,8 (C_5).

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*S*, 6*R*)-1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1, 2, 3, 4-tétraol 233



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de l'aldéhyde **S-219** en solution dans l'eau (0,74 mmol), de DHAP (0,62 mmol), 30 U de l'aldolase et 41 U de la phytase. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH : 80/20). On obtient 62 mg d'un solide légèrement jaune.

Rendement = 44 %.

R_f = 0,2 (CH_2Cl_2 / MeOH : 85/15) (rév : solution de KMnO_4).

P_f = 119°C

$[\alpha]_D^{25} = 26$ ($c = 1,3$, CH_3OH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3481 (OH) ; 1544 (NO) ; 1378 (CN) ; 1063 (CO).

RMN¹H (400MHz, MeOD) δ : 4,73 (m, 1H, H_6) ; 3,71 (d, 1H, H_{7B} , $J_{\text{H}_{7B}-\text{H}_{7A}} = 11 \text{ Hz}$) ; 3,44 (dd, 1H, H_3 , $J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 9,3 \text{ Hz}$) ; 3,33 (m; 1H, H_4) ; 3,31 (d, 1H, H_2 , $J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,27 (d, 1H, H_{7A} , $J_{\text{H}_{7A}-\text{H}_{7B}} = 11 \text{ Hz}$) ; 1,37 (ddd, 1H, H_{5ax} , $J_{\text{H}_{5ax}-\text{H}_6} = 11,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{5ax}-\text{H}_{5eq}} = 13,2 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{5ax}-\text{H}_4} = 12 \text{ Hz}$) ; 2,09 (ddd, 1H, H_{5eq} , $J_{\text{H}_{5eq}-\text{H}_{5ax}} = 13,2 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{5eq}-\text{H}_6} = 4,2 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{5eq}-\text{H}_4} = 4,1 \text{ Hz}$).

RMN¹³C (100 MHz, MeOD) δ : 82,9 (C_6) ; 78,9 (C_1) ; 72,9 (C_3) ; 70,2 (C_2) ; 68,5 (C_4) ; 61,9 (C_7) ; 32,0 (C_5).

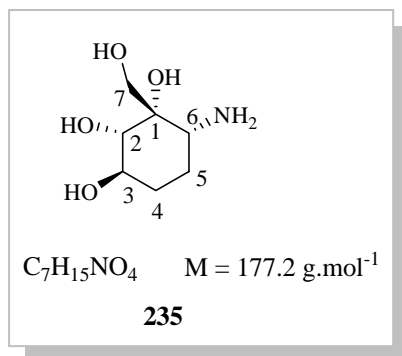
VII. Synthèse des aminocyclitols

VII.1. Schéma général

Le nitrocyclitol (1 mmol) est dissous dans 40 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5). On additionne 15 % de la masse du nitrocyclitol en oxyde de platine. La solution est dégazée sous pression réduite et mise sous pression d'hydrogène à 50 psi. Après 48 heures d'agitation à température ambiante, la réaction est terminée. Le catalyseur est éliminé par ultra-filtration et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié sur une résine échangeuse de cations (Dowex 50×8, H⁺) éluée à l'eau distillée, puis à l'ammoniaque 1N.

VII.2. Synthèse

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 6*R*)-6-amino-1-hydroxyméthylcyclohexane-1,2,3-triol **235**



La synthèse de l'aminocyclitol a été réalisée selon le protocole général à partir de 480 mg (2.7 mmol) de **221** en solution dans 100 mL un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et 80 mg d'oxyde de platine. Après purification, on obtient 327 mg d'un solide blanc.

Rendement = 80%.

Rf = 0,42 (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (1M) : 80/10/10) (rév : KMnO₄).

Pf = 75°C

$[\alpha]_D^{25} = -6$ (c = 1,4, H₂O).

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3400-3300 (OH, NH) ; 1376 (CN).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) **δ** : 3,77 (d_{AB}, 1H, H_{7a}, J_{AB} = 11,2 Hz) ; 3,67 (ddd, 1H, H₃, J_{H3-H4ax} = 13 Hz, J_{H3-H2} = 11 Hz, J_{H3-H4eq} = 4,7 Hz) ; 3,64 (d_{AB}, 1H, H_{7b}, J_{H7b-H7a} = 11,2 Hz) ; 3,28 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 11 Hz) ; 3,02 (dd, 1H, H₆, J_{H6-H5ax} = 11 Hz, J_{H6-H5eq} = 5 Hz) ; 1,92 (m, 1H, H_{4eq}) ; 1,72 (m, 2H, H₅) ; 1,32 (m, 1H, H_{4ax}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 75,8 (C_2) ; 74,9 (C_1) ; 70,9 (C_3) ; 64,9 (C_7) ; 53,9 (C_6) ; 31,3 (C_4) ; 25,3 (C_5).

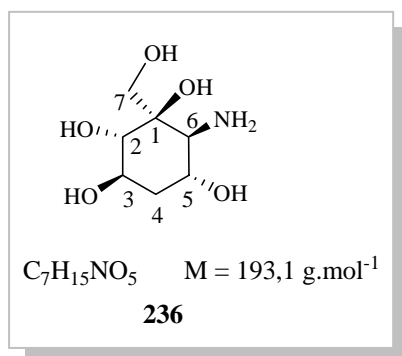
SM (IC) : m/z: 178 ($\text{M}+\text{H}^+$), 160 [$\text{M}+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}$] ; 142 [$\text{M}+\text{H}^+-2\text{H}_2\text{O}$].

Analyse élémentaire :

$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (177,2)

	C %	H %	N%
Calculés :	47,45	8,53	7,90
Trouvés :	47,47	8,72	7,64

(1R, 2S, 3R, 5R, 6S)-6-amino-1-hydroxyméthylcyclohexane-1,2,3,5-tétraol 236



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de 80 mg (0,32 mmol) de nitrocyclitol **226** en solution dans 12 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 12 mg d'oxyde de platine. On obtient 48 mg d'un solide blanc.

Rendement = 78 %.

Rf = 0,32 ($CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH$ (1M) : 50/40/10) (rév : $KMnO_4$).

Pf = 76°C

$[\alpha]_D^{25} = +7$ (c = 1,2, H_2O).

IR (KBr) ν : (cm^{-1}) 3414 (OH) ; 1619 (CN) 1110 (CO).

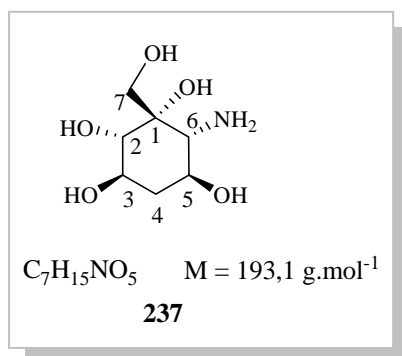
SM (IC): m/z : 193,2 $[M+H]^+$.

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 4 (ddd, 1H, H_3 , $J_{H3-H2} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H3-H4ax} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H3-H4eq} = 3 \text{ Hz}$) ; 3,92 (ddd, 1H, H_5 , $J_{H5-H4ax} = 11 \text{ Hz}$, $J_{H5-H4eq} = 4 \text{ Hz}$, $J_{H5-H6} = 11 \text{ Hz}$) ; 3,75 (d, 1H, H_2 , $J_{H2-H3} = 3 \text{ Hz}$) ; 3,73 (d, 1H, H_{7B} , $J_{H7B-H7A} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,62 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H7A-H7B} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,16 (d; 1H, H_6 , $J_{H6-H5} = 10 \text{ Hz}$) ; 2,07 (ddd, 1H, H_{4eq} , $J_{H4eq-H3} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H4eq-H5} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H4eq-H4ax} = 13,5 \text{ Hz}$) ; 1,83 (ddd, 1H, H_{4ax} , $J_{H4ax-H3} = 3 \text{ Hz}$, $J_{H4ax-H5} = 11 \text{ Hz}$, $J_{H4ax-H4A} = 13,5 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 74,8 (C_1) ; 70,1 (C_3) ; 69,9 (C_2) ; 65,5 (C_7) ; 64,2 (C_5) ; 57,3 (C_6) ; 33,9 (C_4).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+H]^+$: masse théorique = 194,1028
masse trouvée = 194,1035

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 5*S*, 6*R*)-6-amino-1-hydroxyméthylcylohexane-1,2,3,5-tétraol 237



Selon le protocole général, la synthèse de l'aminocyclitol **237** a été réalisée à partir de 276 mg (1,23 mmol) de **227** en solution dans 50 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 42 mg d'oxyde de platine. On obtient 181 mg d'un solide blanc.

Rendement = 76 %.

Rf = 0,22 ($CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH$ (1M) : 50/40/10) (rév : $KMnO_4$).

Pf = 101°C

$[\alpha]_D^{25} = -8$ ($c = 1,1$, H_2O).

SM (IC): m/z : 193,2 $[M+H]^+$.

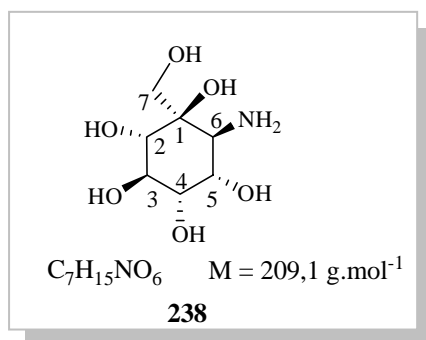
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3470-3414 (OH, NH) ; 1110 (C-O).

RMN¹H (400MHz, D_2O) δ : 4,65 (d, 1H, H_6 , $J_{H6-H5} = 10,2$ Hz); 4,5(ddd; 1H, H_5 , $J_{H5-H4ax} = 11,7$ Hz, $J_{H5-H6} = 10,2$ Hz, $J_{H5-H4eq} = 5,1$ Hz) ; 3,8 (ddd, 1H, H_3 , $J_{H3-H4ax} = 12$ Hz, $J_{H3-H2} = 9,3$ Hz, $J_{H3-H4eq} = 4,7$ Hz) ; 3,78 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H7A-H7B} = 11$ Hz) ; 3,4 (d, 1H, H_2 , $J_{H2-H3} = 9,4$ Hz) ; 3,25 (d, 1H, H_{7A} , $J_{H7A-H7B} = 11$ Hz) ; 2,27 (ddd, 1H, H_{4eq} , $J_{H4eq-H4ax} = 12$ Hz, $J_{H4eq-H5} = 5,1$ Hz, $J_{H4eq-H3} = 4,7$ Hz) ; 1,43 (ddd, 1H, H_{4ax} , $J_{H4ax-H3} = 12$ Hz, $J_{H4ax-H5} = 12,2$ Hz, $J_{H4ax-H4eq} = 12$ Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, D_2O) δ : 74,4 (C_1) ; 70,1 (C_3) ; 69,9 (C_2) ; 65,7 (C_7) ; 63,6 (C_5) ; 57,7 (C_6) ; 33,9 (C_4).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+H]^+$: masse théorique = 194,1028
masse trouvée = 194,1037

(1R, 2S, 3R, 4S, 5S, 6S)-6-amino-1-hydroxyméthylcylohexane-1,2,3,4,5-pentaol 238



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de 110 mg (0,45 mmol) de **228** en solution dans 18 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 17 mg d'oxyde de platine. On obtient 67 mg d'un solide blanc.

Rendement = 71 %.

Rf = 0,17 (MeOH/NH₄OH (1M) : 70/30) (rév : KMnO₄).

Pf = 129°C

$[\alpha]_D^{25} = -11$ (c = 1,1, H₂O).

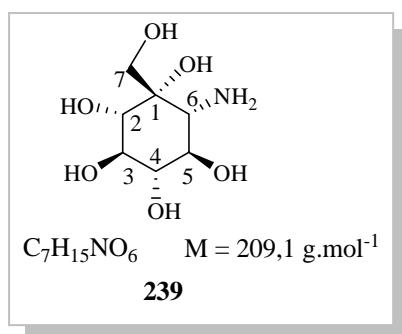
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3469-3405 (OH, NH) ; 1383 (CN) ; 1055 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 4,10 (dd, 1H, H₅, J_{H5-H6} = 9,8 Hz, J_{H5-H4} = 3 Hz) ; 4,02 (m, 1H, H₃) ; 4,00 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 3 Hz) ; 3,83 (d, 1H, H_{7B}, J_{H7B-H7A} = 11,8 Hz) ; 3,76 (m, 1H, H₄) ; 3,74 (d, 1H, H_{7A}, J_{H7A-H7B} = 11,8 Hz) ; 3,63 (d; 1H, H₆, J_{H6-H5} = 9,8 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 74,3 (C₁) ; 72 (C₄) ; 71,7 (C₂) ; 71,3 (C₃) ; 66,2 (C₅) ; 65,3 (C₇) ; 53,2 (C₆).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+H]⁺ : masse théorique = 210,0978
masse trouvée = 210,0990

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*R*, 6*R*)-6-amino-1-hydroxyméthylcylohexane-1,2,3,4,5-pentaol 239



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de 160 mg (0,67 mmol) de **230** en solution dans 26 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 24 mg d'oxyde de platine. On obtient 104 mg d'un solide blanc.

Rendement = 74 %.

Rf = 0,20 (MeOH/NH₄OH (1M) : 70/30) (rév : KMnO₄).

Pf = 109°C

$[\alpha]_D^{25} = +3$ (c = 1,05, H₂O).

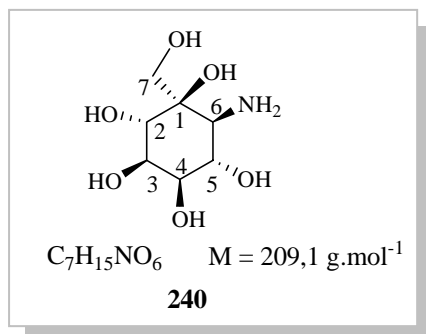
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3470-3406 (OH, NH) ; 1376 (CN) ; 1056 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 3,65 (dd, 1H, H₄, $J_{H4-H5} = J_{H4-H3} = 11,7$ Hz); 3,95 (dd, 1H, H₃, $J_{H3-H4} = J_{H3-H2} = 11,6$ Hz) ; 3,49 (d, 1H, H_{7B}, $J_{H7B-H7A} = 9,8$ Hz) ; 3,45 (d, 1H, H₂, $J_{H2-H3} = 9,7$ Hz) ; 3,35 (d, 1H, H_{7A}, $J_{H7A-H7B} = 9,8$ Hz) ; 3,21 (dd, 1H, H₅, $J_{H5-H4} = 11,7$ Hz, $J_{H5-H6} = 9,4$ Hz,) ; 3,00 (d, 1H, H₆, $J_{H6-H5} = 9,4$ Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 74,2 (C₄) ; 73,9 (C₁) ; 72,6 (C₃) ; 71,3 (C₅) ; 71,2 (C₂) ; 62,2 (C₇) ; 54,6 (C₆).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+H]^+$: masse théorique = 210,0978
masse trouvée = 210,0988

(1*R*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*, 6*S*)-6-amino-1-hydroxyméthylcyclohexane-1,2,3,4,5-pentaol 240



La synthèse de l'aminocyclitol **240** est réalisée selon le protocole général de la réduction, à partir de 140 mg (0,58 mmol) de **230** en solution dans 25 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 22 mg d'oxyde de platine. On obtient 80 mg d'un solide blanc.

Rendement = 65 %.

Rf = 0,27 (MeOH/NH₄OH (1M) : 70/30) (rév : KMnO₄).

Pf = 116°C

$[\alpha]_D^{25} = +23$ (c = 1, H₂O).

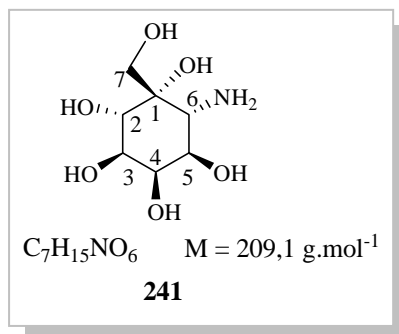
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3471-3405 (OH, NH) ; 1383 (CN).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 4,10 (m, 1H, H₅) ; 4,07 (m, 1H, H₃) ; 3,69 (m, 1H, H₂) ; 3,63 (d, 1H, H_{7B}, $J_{H7B-H7A} = 11,7$ Hz) ; 3,56 (d, 1H, H_{7A}, $J_{H7A-H7B} = 11,7$ Hz) ; 3,43 (m, 1H, H₅) ; 2,66 (d; 1H, H₆, $J_{H6-H5} = 9,8$ Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 76,8 (C₁) ; 73,2 (C₄) ; 71,4 (C₅) ; 70,9 (C₂) ; 69,1 (C₃) ; 64,4 (C₇) ; 54,5 (C₆).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+H]⁺ : masse théorique = 210,0978
masse trouvée = 210,0985

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*)-6-amino-1-hydroxyméthylcyclohexane-1,2,3,4,5-pentaol 241



Selon le protocole général, la synthèse est réalisée à partir de 130 mg (0,54 mmol) de **231** en solution dans 24 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 20 mg d'oxyde de platine. On obtient 68 mg d'un solide blanc.

Rendement = 60 %.

Rf = 0,18 (MeOH/NH₄OH (1M) : 70/30) (rév : KMnO₄).

Pf = 89°C

$[\alpha]_D^{25} = +9$ (c = 0,86, H₂O).

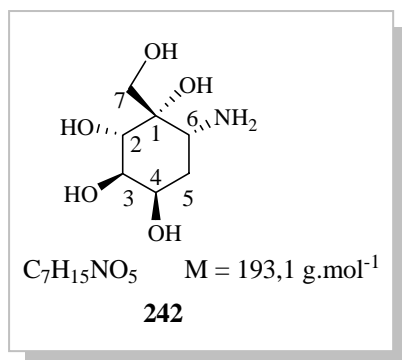
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3469-3406 (OH, NH) ; 1384 (CN).

RMN ¹H (400MHz, D₂O) δ : 4 (m, 1H, H₄) ; 3,67 (d; 1H, H₂, J_{H2-H3} = 9,4 Hz) ; 3,65 (m, 1H, H₃) ; 3,85 (d, 2H, H₇, J_{H7A-H7B} = 10,4 Hz) ; 3,5 (m, 1H, H₅) ; 2,98 (d, 1H, H₆, J_{H6-H5} = 10,6 Hz).

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ : 74,5 (C₄) ; 71,7 (C₄) ; 70,4 (C₅) ; 70,1 (C₂) ; 68,8 (C₃) ; 61,5 (C₇) ; 51,3 (C₆).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+H]⁺ : masse théorique = 210,0978
masse trouvée = 210,0988

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*R*)-6-amino-1-hydroxyméthylcyclohexane-1,2,3,4-tétraol 242



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de 98 mg (0,44 mmol) de nitrocyclitol **232** en solution dans 18 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 15 mg d'oxyde de platine. On obtient 68 mg d'un solide blanc.

Rendement = 80 %.

Rf = 0,21 (MeOH/NH₄OH (1M) : 70/30) (rév : KMnO₄).

Pf = 74°C

$[\alpha]_D^{25} = -20$ (c = 1,04, H₂O).

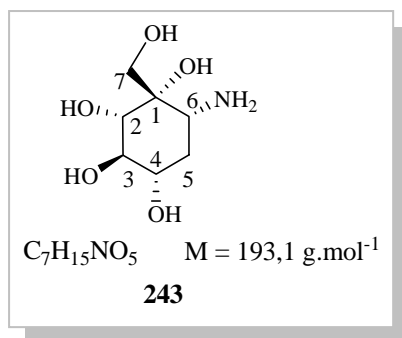
IR (pur) v (cm⁻¹) : 3470-3415 (OH, NH) ; 1618 (CN) , 1102 (CO).

RMN ¹H (400MHz, D₂O) **δ** : 3,98 (m; 1H, H₄) ; 3,66 (m, 1H, H₃) ; 3,64 (d, 2H, H₇, J_{H7A-H7B} = 12 Hz) ; 3,61 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 10,1 Hz) ; 3,28 (dd, 1H, H₆, J_{H6-H5ax} = 11,5 Hz, J_{H6-H5eq} = 3,6 Hz) ; 1,83 (ddd, 1H, H_{5eq}, J_{H5eq-H5ax} = 12,2 Hz, J_{H5eq-H6} = 3,6 Hz, J_{H5eq-H4} = 4,1 Hz) ; 1,72 (ddd, 1H, H_{5ax}, J_{H5ax-H5eq} = 12,2 Hz, J_{H5ax-H6} = J_{H5ax-H4} = 11,5 Hz).

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) **δ** : 75,3 (C₁) ; 71,2 (C₂) ; 69,1 (C₃) ; 67,6 (C₄) ; 61,8 (C₇) ; 46,5 (C₆) ; 32,6 (C₅).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+H]⁺ : masse théorique = 194,1028
masse trouvée = 194,1018

(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*S*, 6*R*)-6-amino-1-hydroxyméthylcyclohexane-1,2,3,4-tétraol 243



La synthèse est réalisée selon le protocole général à partir de 30 mg (0,13 mmol) de **233** en solution dans 6 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95/5) et de 10 mg d'oxyde de platine. On obtient 20 mg d'un solide blanc.

Rendement = 80 %.

Rf = 0,21 (MeOH/NH₄OH (1M) : 70/30) (rév : KMnO₄).

$[\alpha]_D^{25} = -14$ ($c = 0,3$, H₂O).

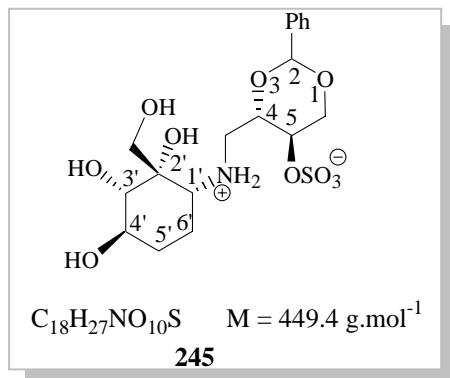
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3469-3415 (OH, NH) ; 1318 (CN) , 1100 (CO).

RMN ¹H (400MHz, D₂O) δ : 3,44 (d; 1H, H₂, $J_{H_2-H_3} = 9,4$ Hz) ; 3,42 (m, 1H, H₃) ; 3,27 (m, 1H, H₄) ; 3,23 (d, 2H, H₇, $J_{H_7A-H_7B} = 13$ Hz) ; 2,83 (dd, 1H, H₆, $J_{H_6-H_{5ax}} = 13,6$ Hz, $J_{H_6-H_{5eq}} = 4,4$ Hz) ; 2,19 (ddd, 1H, H_{5eq}, $J_{H_{5eq}-H_{5ax}} = 12,2$ Hz, $J_{H_{5eq}-H_6} = 4,4$ Hz, $J_{H_{5eq}-H_4} = 4,1$ Hz) ; 1,49 (ddd, 1H, H_{5ax}, $J_{H_{5ax}-H_{5eq}} = 12,2$ Hz, $J_{H_{5ax}-H_6} = J_{H_{5ax}-H_4} = 12,3$ Hz).

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ : 75,1 (C₁) ; 75,0 (C₄) ; 72,1 (C₃) ; 69,2 (C₂) ; 63,0 (C₇) ; 56,8 (C₆) ; 30,8 (C₅).

VIII. Synthèse des zwitterions

sulfate de (4*S*,5*R*)-2-phényl-4-(((1'*R*,2'*S*,3'*S*,4'*R*)-2',3',4'-trihydroxy-2'-(hydroxyméthyl)cyclohexylammonio)méthyl)-1,3-dioxan-5-yle **245**



L'aminocyclitol **235** (66 mg, 0,37 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol (140 mg, 0,52 mmol, 1,4 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (20 mg, 0,18 mmol, 0,5 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 24 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 70/30) pour donner 114 mg d'un solide blanc.

Rendement = 69%.

R_f = 0,52 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 70/30) (rév : solution de $KMnO_4$).

P_f = 161°C.

$[\alpha]_D^{25} = -54$ (c = 0,98, MeOH).

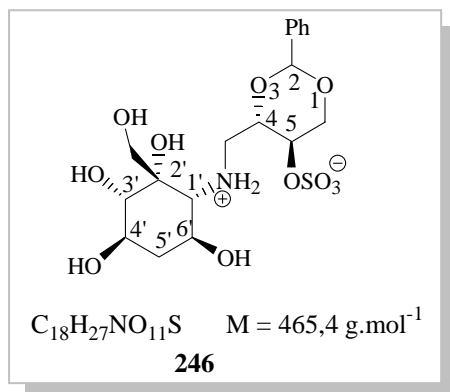
IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3415 (OH) ; 1619 (NH^+) ; 1232 (OSO_3^-) ; 1097 et 1014 (CO).

RMN 1H (400 MHz, MeOD) δ : 7,22-7,2 (m, 2H, H_{arom}) ; 7,08-7,04 (m, 3H, H_{arom}) ; 5,38 (s, 1H, $H_{5'}$) ; 4,19 (dd, 1H, $H_{4b'}$, $J_{H4b'-H4a'} = 10,6$ Hz, $J_{H4b'-H3'} = 4,4$ Hz) ; 4,04 (m, 1H, $H_{3'}$) ; 3,86 (m, 1H, $H_{2'}$) ; 3,73 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,6$ Hz) ; 3,52 (dd, 1H, $H_{4a'}$, $J_{H4a'-H4b'} = 10,6$ Hz, $J_{H4a'-H3'} = 4,4$ Hz) ; 3,5 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,6$ Hz) ; 3,36 (m, 1H, H_3) ; 3,22 (m, 1H, H_6) ; 3,2 (m, 2H, $H_{1'}$) ; 3,02 (d, 1H, H_2 , $J_{H2-H3} = 9,2$ Hz) ; 1,73 (m, 1H, H_{5b}) ; 1,68 (m, 1H, H_{4b}) ; 1,51 (m, 1H, H_{5a}) ; 0,98 (m, 1H, H_{4a}).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 137 (C_{arom}) ; 128,6-127,7-125,9 (C_{arom}) ; 101,05 ($C_{5'}$) ; 75,08 (C_2 et C_3) ; 73,1 (C_1) ; 69,2 (C_3) ; 68,5 ($C_{4'}$) ; 66,9 (C_7) ; 66,8 ($C_{2'}$) ; 61,5 (C_6) ; 45,5 ($C_{1'}$) ; 28,2 (C_4) ; 21,4 (C_5).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+H]^+$: masse théorique = 450,144
masse trouvée = 450,1420

sulfate de (4*S*,5*R*)-2-phényl-4-(((1'*R*,2'*S*,3'*S*,4'*R*,6'*S*)-2',3',4',6'-tétrahydroxy-2'-(hydroxyméthyl)cyclohexylammonio)méthyl)-1,3-dioxan-5-yle 246



L'aminocyclitol **237** (77 mg, 0,39 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol (160 mg, 0,58 mmol, 1,5 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (25 mg, 0,23 mmol, 0,6 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 24 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 70/30) pour donner 101 mg d'un solide blanc.

Rendement = 54%.

Rf = 0,29 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 70/30) (rév : solution de $KMnO_4$).

$[\alpha]_D^{25} = -13$ (c = 0,8, MeOH).

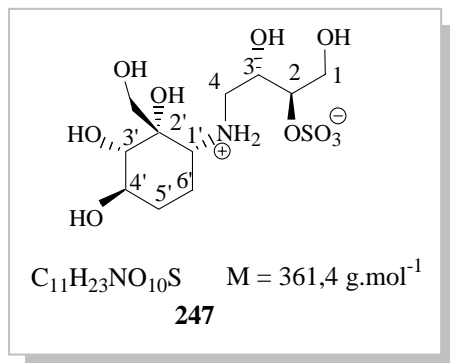
IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3414 (OH) ; 1619 (NH^+) ; 1234 (OSO_3^-) ; 1101 (CO).

RMN 1H (400 MHz, MeOD) δ : 7,54-7,52 (m, 2H, H_{arom}) ; 7,38-7,36 (m, 3H, H_{arom}) ; 5,564 (s, 1H, $H_{5'}$) ; 4,43 (dd, 1H, $H_{4b'}$, $J_{H_{4b'}-H_{4a'}} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{H_{4b'}-H_{3'}} = 3,8 \text{ Hz}$) ; 4,54 (m, 1H, $H_{3'}$) ; 4,34 (m, 1H, $H_{2'}$) ; 4,14 (m, 1H, H_3) ; 3,91 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,7 \text{ Hz}$) ; 3,84 (dd, 1H, $H_{4a'}$, $J_{H_{4a'}-H_{4b'}} = 16,9 \text{ Hz}$, $J_{H_{4a'}-H_{3'}} = 3 \text{ Hz}$) ; 3,81 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,7 \text{ Hz}$) ; 3,78 (m, 1H, $H_{1'b}$) ; 3,73 (m, 1H, $H_{1a'}$) ; 3,7 (m, 1H, H_5) ; 3,24 (d, 1H, H_2 , $J_{H_2-H_3} = 8,6 \text{ Hz}$) ; 3,17 (d, 1H, H_6 , $J_{H_6-H_5} = 9,6 \text{ Hz}$) ; 2,23 (m, 1H, H_{4b}) ; 1,43 (m, 1H, H_{4a}).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 138,6 (C_{arom}) ; 130,1-129,2-127,5 (C_{arom}) ; 102,5 ($C_{5'}$) ; 77,7 ($C_{3'}$) ; 76,2 (C_2) ; 74,9 (C_1) ; 70,2 ($C_{4'}$) ; 69 (C_3) ; 68,9 (C_5) ; 68,4 ($C_{2'}$) ; 67,1 (C_6) ; 67 (C_7) ; 50,3 ($C_{1'}$) ; 40,1 (C_4).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : $[M+H]^+$: masse théorique = 466,1383
masse trouvée = 466,1378

sulfate de (2*R*,3*S*)-1,3-dihydroxy-4-((1'*R*,2'*S*,3'*S*,4'*R*)-2',3',4'-trihydroxy-2'-(hydroxyméthyl)cyclohexylammonio)butan-2-yle 247



Le zwitterion **245** (122 mg, 0,27 mmol) est dissous dans un mélange acide acétique-eau 4/1 (5 mL). On ajoute du palladium sur charbon à 10% (80 mg) et le milieu est agité sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant 24 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration sur membrane et rincé avec de l'eau distillée. Le milieu est concentré sous pression réduite et purifié sur une résine échangeuse de cations (Dowex 50×8, forme H⁺) éluée à l'eau distillée. On isole 60 mg d'un solide blanc.

Rendement = 61 %.

Rf = 0,22 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (1M) : 50/40/10) (rév : solution de KMnO₄).

Pf : décomposition

$[\alpha]_D^{25} = -54$ (c = 0,98 ; MeOH).

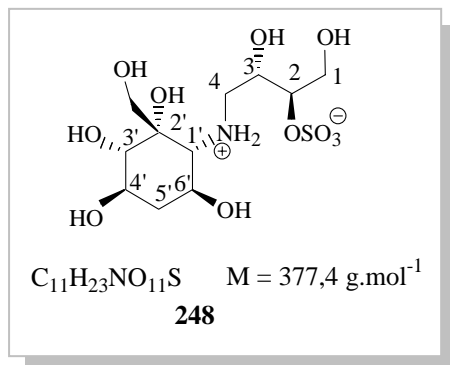
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3415 (OH) ; 1619 (NH⁺) ; 1232 (OSO₃⁻) ; 1097 et 1014 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ : 4,14 (m, 1H, H_{3'}) ; 4,02 (m, 1H, H_{2'}) ; 3,94 (d_{AB}, 1H, H_{7b}, J_{AB} = 11,9 Hz) ; 4,83 (dd, 1H, H_{4b'}, J_{H4b'-H4a'} = 12,7 Hz, J_{H4b'-H3'} = 3,4 Hz) ; 3,72 (d_{AB}, 1H, H_{7a}, J_{AB} = 11,9 Hz) ; 3,69 (dd, 1H, H_{4a'}, J_{H4a'-H4b'} = 12,7 Hz, J_{H4a'-H3'} = 7,6 Hz) ; 3,6 (m, 1H, H₃) ; 3,38 (dd, 1H, H₆, J_{H6-H5a} = 12,1 Hz, J_{H6-H5b} = 4,1 Hz) ; 3,23 (m, 2H, H_{1'}) ; 3,09 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 9,5 Hz) ; 1,9 (m, 1H, H_{5b}) ; 1,86 (m, 1H, H_{4b}) ; 1,51 (ddd, 1H, H_{5a}, J_{H5a-H5b} = 13,5 Hz, J_{H5a-H4b} = 3,9 Hz, J_{H5a-H4a} = 13 Hz) ; 1,16 (ddd, 1H, H_{4a}, J_{H4a-H4b} = 11,7 Hz, J_{H4a-H5a} = 13 Hz, J_{H4a-H5b} = 3,5 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ : 79,3 (C_{3'}) ; 74,8 (C₂) ; 73,9 (C₁) ; 69,2 (C₃) ; 66,2 (C₇) ; 64,6 (C_{2'}) ; 60,5 (C₆) ; 59,4 (C_{4'}) ; 47,1 (C_{1'}) ; 27,9 (C₄) ; 21,4 (C₅).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+H]⁺ : masse théorique = 362,1121
masse trouvée = 362,1125

sulfate de (2*R*,3*S*)-1,3-dihydroxy-4-((1'*R*,2'*S*,3'*S*,4'*R*,6'*S*)-2',3',4',6'-tétrahydroxy-2'-(hydroxyméthyl)cyclohexylammonio)butan-2-yle 248



Le zwitterion **246** (49 mg, 0,1 mmol) est dissous dans un mélange acide acétique-eau 4/1 (4 mL). On ajoute du palladium sur charbon à 10% (20 mg) et le milieu est agité sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant 24 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration sur membrane et rincé avec de l'eau distillée. Le milieu est concentré sous pression réduite et purifié sur une résine échangeuse de cations (Dowex 50×8, forme H^+) éluée à l'eau distillée. On isole 23 mg d'un solide blanc.

Rendement = 60 %.

Rf = 0,31 ($CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$ (1M) : 50/40/10) (rév : solution de $KMnO_4$).

Pf : décomposition.

$[\alpha]_D^{25} = +7$ ($c = 1,2$, H_2O).

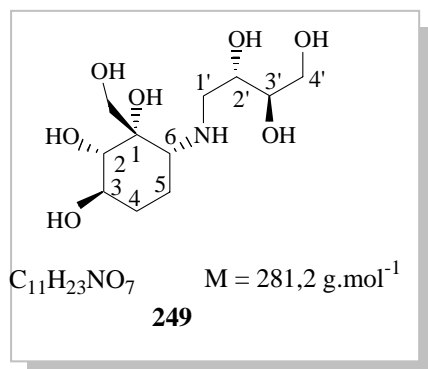
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3410-3300 (OH, NH) ; 1376 (CN).

SM (IC): m/z : 193.2 $[M+H^+]$.

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 4,2 (ddd, 1H, $H_{3'}$, $J_{H_{3'}-H_{2'}} = 6,8 \text{ Hz}$, $J_{H_{3'}-H_{4'a}} = 3,9 \text{ Hz}$, $J_{H_{3'}-H_{4'b}} = 3,1 \text{ Hz}$) ; 4,12 (m, 1H, $H_{2'}$) ; 4,02 (ddd, 1H, H_5 , $J_{H_5-H_{4ax}} = 12,3 \text{ Hz}$, $J_{H_5-H_{4eq}} = 4,8 \text{ Hz}$, $J_{H_5-H_6} = 11 \text{ Hz}$) ; 3,91 (dd, 1H, $H_{4b'}$, $J_{H_{4b'}-H_{4a'}} = 12,9 \text{ Hz}$, $J_{H_{4b'}-H_{3'}} = 3,5 \text{ Hz}$) ; 3,86 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,7 \text{ Hz}$) ; 3,82 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,7 \text{ Hz}$) ; 3,78 (dd, 1H, $H_{4a'}$, $J_{H_{4a'}-H_{4b'}} = 12,9 \text{ Hz}$, $J_{H_{4a'}-H_{3'}} = 4,1 \text{ Hz}$) ; 3,72 (m, 1H, H_3) ; 3,5 (m, 1H, $H_{1'b}$) ; 3,38 (m, 1H, $H_{1'a}$) ; 3,26 (d, 1H, H_2 , $J_{H_2-H_3} = 9,6 \text{ Hz}$) ; 3,19 (d, 1H, H_6 , $J_{H_6-H_5} = 8,1 \text{ Hz}$) ; 2,25 (ddd, 1H, H_{4b} , $J_{H_{4b}-H_{4a}} = 11,2 \text{ Hz}$, $J_{H_{4b}-H_3} = 3,5 \text{ Hz}$, $J_{H_{4b}-H_5} = 11,2 \text{ Hz}$) ; 1,43 (ddd, 1H, H_{4a} , $J_{H_{4a}-H_{4b}} = 11,2 \text{ Hz}$, $J_{H_{4a}-H_5} = 14,6 \text{ Hz}$, $J_{H_{4a}-H_{5b}} = 3,5 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ : 79,8 ($C_{3'}$) ; 74,3 (C_2) ; 74,2 (C_1) ; 67,6 (C_3) ; 66,1 ($C_{2'}$) ; 65,9 (C_5) ; 65,7 (C_6) ; 64,9 ($C_{4'}$) ; 59,5 (C_7) ; 50,7 ($C_{1'}$) ; 37,9 (C_4).

N-((2'S,3'R)-2',3',4'-trihydroxybutyl)-(1S,2S,3R,6R)-1-(hydroxymethyl)-6-aminocyclohexane-1,2,3-triol **249**



Une solution de zwitterion **247** (30 mg, 0,083 mmol) dans 3 mL de 1,4-dioxane est chauffé à 40°C en présence d'eau (30 µL) et d'acide sulfurique concentré (20 µL) pendant 24 heures. Le milieu est neutralisé par de l'ammoniaque (1 N) et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur une résine échangeuse de cations (Dowex 50×8, H⁺) éluée à l'eau distillée, puis à l'ammoniaque 1N. On obtient 21 mg d'un solide blanc.

Rendement = 89%.

Rf = 0,42 (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (1M) : 80/10/10) (rév : solution de KMnO₄).

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3400-3300 (OH, NH) ; 1376 (CN).

Pf = 228°C

$[\alpha]_D^{25} = -10$ (c = 1,3, H₂O).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ : 3,97 (d_{AB}, 1H, H_{7a}, J_{AB} = 11,5 Hz) ; 3,87 (m, 1H, H_{2'}) ; 3,8 (d_{AB}, 1H, H_{7b}, J_{AB} = 11,5 Hz) ; 4,68 (dd, 2H, H_{4'}, J_{H4b'-H4a'} = 12,5 Hz, J_{H4'-H3'} = 3,3 Hz) ; 3,63 (m, 1H, H₃) ; 3,58 (m, 2H, H_{1'}) ; 3,43 (dd, 1H, H₆, J_{H6-H5a} = 10,1 Hz, J_{H6-H5b} = 4,8 Hz) ; 3,24 (ddd, 1H, H_{3'}, J_{H3'-H4'a} = 10,5 Hz, J_{H3'-H2'} = 7,7 Hz, J_{H3'-H4'b} = 4,3 Hz) ; 3,17 (d, 1H, H₂, J_{H2-H3} = 9,1 Hz) ; 2,02 (m, 1H, H_{5b}) ; 1,98 (m, 1H, H_{4b}) ; 1,69 (ddd, 1H, H_{5a}, J_{H5a-H5b} = 13 Hz, J_{H5a-H4b} = 3,2 Hz, J_{H5a-H4a} = 12,9 Hz) ; 1,28 (ddd, 1H, H_{4a}, J_{H4a-H4b} = 12,4 Hz, J_{H4a-H5a} = 13 Hz, J_{H4a-H5b} = 4,3 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ : 82,9 (C_{3'}) ; 74,6 (C₁) ; 73,9 (C₂) ; 69,2 (C₃) ; 66,1 (C₇) ; 66 (C_{2'}) ; 62,1 (C_{4'}) ; 60,3 (C₆) ; 47,3 (C_{1'}) ; 27,8 (C₄) ; 21,2 (C₅).

Masse haute résolution (ESI-HRMS) : [M+H]⁺ : masse théorique = 282,1553
masse trouvée = 282,1550

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ David, S. *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres* **1995**, InterEditions / CNRS Editions, 58-61.
- ² Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, 280, 309-316.
- ³ Coutinho, P. M. ; Henrissat, B. *Carbohydrate-Active Enzymes Server* **1999**, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>
- ⁴ Winchester B. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, 699.
- ⁵ Stryer, L. *La biochimie de Lubert Stryer* **1992**, Médecine-Sciences Flammarion.
- ⁶ Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- ⁷ Lennarz, W. J. *Biochemistry* **1987**, 26, 7205-7210.
- ⁸ Koshland D.E. *Bio. Rev.* **1953**, 28, 416.
- ⁹ Davies, G. J. ; Gloster, T. M. ; Henrissat, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 637-645.
- ¹⁰ McCarter, J. D. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 885-892.
- ¹¹ Wang, Q. ; Graham, R. W. ; Trimbur, D. ; Warren, R. A. J. ; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11594-11595.
- ¹² Ly H. D. ; Withers S. G. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 487 et références citées.
- ¹³ Heightman, T. D.; Vasella, A. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2300.
- ¹⁴ Rye C. S. ; Withers S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 573.
- ¹⁵ Vasella, A. ; Davies, G. J. ; Böhm, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 619-629.
- ¹⁶ Sulzenbacher, G. ; Driguez, H. ; Henrissat, B. ; Schülein, M. ; Davies, G. J. *Biochemistry* **1996**, 35, 15280-15287.
- ¹⁷ Davies, G. J. ; Mackenzie, L. ; Varot, A. ; Dauter, M. ; Brzozowski, A. M. ; Schülein, M. ; Withers, S. G. *Biochemistry* **1998**, 37, 11707-11713.
- ¹⁸ Numao, S. ; Kuntz, D. A. ; Withers, S. G. ; Rose, D. R. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 48074-48083.
- ¹⁹ Zechel, D. L. ; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 11-18.
- ²⁰ Stam, M. R. ; Blanc, E. ; Coutinho, P. M. ; Henrissat, B. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2728.
- ²¹ Terwisscha van Scheltinga, A. C. ; Armand, S. ; Kalk, K. H. ; Isogai, A. ; Henrissat, B. ; Dijkstra, B. W. *Biochemistry* **1995**, 34, 15619-15623.
- ²² Mark, B. L. ; Vocadlo, D. J. ; Knapp, S. ; Triggs-Raine, B. L. ; Withers S. G. ; James, M. N. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10330-10337.
- ²³ Yip, V. L. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 147-155.
- ²⁴ Asano, N. ; Nash, R. J. ; Molyneux, R. J. ; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 1645-1680.
- ²⁵ Asano, N. *Glycobiology*. **2003**, 13, 93R-104R.

- ²⁶ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Takeuchi, M. ; Yamaguchi, T. ; Matsui, K. ; Horii, S. ; Fukase, H. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1301-1307
- ²⁷ Legler, G. ; Jülich, E. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 61-72.
- ²⁸ Ekhardt, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.
- ²⁹ Yoshikawa, M. ; Morakami, T. ; Shimada, H. ; Matsuda, H. ; Yamahara, J. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8367-7939.
- ³⁰ Anderson, B. ; Rassov, A. ; Westergaard, N. ; Lundgren, K. *Biochem. J.* **1999**, *342*, 545-550.
- ³¹ Jakobsen, P. ; Lundbeck, J. M. ; Kristiansen, M. ; Breinholt, J. ; Demuth, H. ; Pawlas, J. ; Tores Candela, M. P. ; Anderson, B. ; Westergaard, N. ; Lundgren, K. ; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 733-744.
- ³² Butters, T.D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *Glycobiology* **2005**, 43R-52R.
- ³³ Platt, F. M. ; Neises, G. B. ; Karlsson, G. B. ; Dwek, R. A. ; Butters, T. D. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27108.
- ³⁴ Overkleeft, H. S. ; Renkema, G. H. ; Neele, J. ; Vianello, P. ; Hung, I. O. ; Strijland, A. ; van der Burg, A. M. ; Koomen, G.-J. ; Pandit, U. K. ; Aerts, J. M. F. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *41*, 26522-26527.
- ³⁵ Butters, T. D. ; Dwek, R. A. ; Platt, F. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 561.
- ³⁶ Martin, O. R. ; Xie, F. ; Liu, L. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4027-4030.
- ³⁷ Asano, N. ; Nishida, M. ; Kizu, H. ; Matsui, K. ; Watson, A. A. ; Nash, R. J. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 98.
- ³⁸ Ikeda, K. ; Takahashi, M. ; Nishida, M. ; Miyauchi, M. ; Kizu, H. ; Kameda, Y. ; Arisawa, M. ; Watson, A. A. ; Nash, R. J. ; Fleet, G. W. J. ; Asano, N. *Carbohydr. Res.* **2000**, *323*, 73-80.
- ³⁹ Compain, P. ; Martin, O. R. ; Boucheron, C. ; Godin, G. ; Yu, L. ; Ikeda, K. ; Asano, N. *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 1356.
- ⁴⁰ Lin, H. ; Sigumoto, Y. ; Ninomya, H. ; Oka, A. ; Taniguchi, M. ; Ida, H. ; Eto, Y. ; Ogawa, S. ; Matsuzaki, Y. ; Sawa, M. ; Inoue, T. ; Higaki, K. ; Nanba, E. ; Ohno, K. ; Suzuki, Y. *Biochem. Biophys. Acta* **2004**, *1689*, 219.
- ⁴¹ Ogawa, S. ; Matsunga, Y. K. ; Suzuki, Y. *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1967.
- ⁴² Rassu, G. ; Auzas, L. ; Pinna, L. ; Zanardi, F. ; Battistini, L. ; Casiraghi, G. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1213.

- ⁴³ Ogawa, S. ; Toyokuni, T. ; Suami, T. *Chem. Lett.* **1980**, 713.
- ⁴⁴ Ogawa, S. ; Chida, N. ; Toyokuni, T. ; Suami, T. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1203.
- ⁴⁵ Chen, X. ; Fan, Y. ; Zheng, Y. ; Shen, Y. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1955-1977.
- ⁴⁶ Fukase, H. ; Horri, S. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3651-3658.
- ⁴⁷ Horri, S. *Takeda Kenkyusho Ho.* **1993**, 52, 1.
- ⁴⁸ Chang, Y. -K.; Lee, B. -Y.; Kim, D. J.; Lee, G. S.; Jeon, H. B.; Kim, K. S. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3299.
- ⁴⁹ Yoshikawa, M. ; Cha, B. C. ; Ochaichi, Y. ; Takinami, Y. ; Yokokawa, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4236.
- ⁵⁰ Yoshikawa, M. ; Murakami, N. ; Yokokawa, Y. ; Inoue, Y. ; Kuroda, Y. ; Kitagawa, I. *Tetrahedron* **1994**, 50, 9619-9628.
- ⁵¹ Tatsuta, K.; Mukai, H.; Takahashi, M, *J. Antibiot.* **2000**, 53, 430.
- ⁵² Gravier-Pelletier, C. ; Maton, W. ; Dintiger, T. ; Tellier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8705-8720.
- ⁵³ Tietze, L. F. ; Geissler, H. ; Gewert, J. A. ; Jakobi, U. *Synlett* **1994**, 551.
- ⁵⁴ Shing, T. K. M.; Tai, V. W. -F. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5332.
- ⁵⁵ Shing, T. K. M.; Tam, E. K. W. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8468.
- ⁵⁶ Sureshan, K. M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Watanabe, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 8367.
- ⁵⁷ Ogawa, S. ; Asada, M. ; Ooki, Y. ; Mori, M. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4306.
- ⁵⁸ Ogawa, S. ; Uetsuki, S. ; Tezuka, Y. ; Morikawa, T. ; Takahashi, A. ; Sato, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1493.
- ⁵⁹ Mehta, G. ; Mohal, N. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3285.
- ⁶⁰ Mehta, G. ; Lakshminath, S. ; Talukdar, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 335-338.
- ⁶¹ Ogawa, S. ; Nakamoto, K. ; Takahara, M. ; Tanno, Y. ; Chida, N. ; Suami, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1176.
- ⁶² a) Ogawa, S. ; Funayama, S. ; Okazaki, K. ; Ishizuka, F. ; Sakata, Y.; Doi, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5183-5188. b) Ogawa, S. ; Watanabe, M. ; Maruyama, A. ; Hisamatsu, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 749-752. c) Ogawa, S. ; Mori, M. ; Takeuchi, G. ; Doi, F. ; Watanabe, M. ; Sakata, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2811-2814. d) Ogawa, S. ; Sekura, R. ; Maruyama, A. ; Yuasa, H. ; Hashimoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2089-2093.
- ⁶³ Ogawa, S. ; Maruyama, A. ; Odagiri, T. ; Yuasa, H. ; Hashimoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 967-974.

- ⁶⁴ Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Ito, N. ; Watanabe, M. ; Kabawam, K. ; Itoh, M. ; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 995-1002.
- ⁶⁵ Ogawa, S. ; Iwasawa, Y. ; Nose, T.; Suami, T. ; Ohba, S. ; Ito, M. ; Saito, Y. *J Chem Soc. Perkin Trans. I* **1985**, 903-906.
- ⁶⁶ Tsunoda, H. ; Inokuchi, J.-i. ; Yamagishi, K. ; Ogawa, S. *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 279.
- ⁶⁷ Koike, M. ; Numata, M. ; Sugimoto, M. ; Nakamura, Y. ; Ogawa, S. *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 113-121.
- ⁶⁸ Ogawa, S. ; Fujieda, S. ; Sakata, Y. ; Ishizaki, M. ; Hisamatsu, S. ; Okazaki, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3461-3463.
- ⁶⁹ Kameda, Y. ; Horri, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 746.
- ⁷⁰ Kameda, Y. ; Horri, S.; Yamano, T. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 298.
- ⁷¹ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Teranishi, M. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1573.
- ⁷² Kameda, Y. ; Asano, N. ; Teranishi, M. ; Yoshokawa, M. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1573.
- ⁷³ Asano, N. ; Takeuchi, Ninomiya, K. ; Kameda, Y. ; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 859.
- ⁷⁴ Mahmud, T.; Xu, J.; Choi, Y. U. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5066.
- ⁷⁵ Dong, H.; Mahmud, T.; Tornus, I. ; Lee, S.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2733.
- ⁷⁶ Chen, X.; Zheng, Y.; Shen, Y. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1002-1003.
- ⁷⁷ Kameda, Y.; Asano, N.; Yoshikawa, M.; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1575.
- ⁷⁸ Horri, S. ; Fuhase, H. ; Matsuo, T. ; Kameda, Y. ; Asano, N. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046.
- ⁷⁹ Kameda, Y. ; Kawashima, K. ; Takeushi, M. ; Ikeda, K. ; Asano, N. ; Matsui, K. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 259-264.
- ⁸⁰ Ogawa, S.; Ashiura, M.; Chikara, U. ; Watanabe, S.; Yamazaki, C.; Yamagishi, K.; Inokuchi, J.-i. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 929.
- ⁸¹ Ogawa, S. ; Kobayashi, Y. ; Kamayaba, K. ; Jimbo, M. ; Inokuchi, J.-i. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1955.
- ⁸² Matsuda, J. ; Suzuki, O. ; Oshima, A. ; Yamamoto, Y. ; Noguchi, A. ; Takimoto, K. ; Itoh, M. ; Matsuzaki, Y. ; Yasuda, Y. ; Ogawa, S. ; Sakata, Y. ; Nanba, E. ; Higaki, G. ; Ogawa, Y. ; Tominaga, L. ; Ohno, K. ; Iwasaki, H. ; Watanabe, H. ; Brady, R. O. ; Suzuki, Y. *PNAS*, **2003**, *100*, 15912.
- ⁸³ Wong, C.-H. ; Whitesides, G. M. *Enzymes in synthetic Organic Chemistry*, Pergamon Ed., **1994**, p 198-199.

- ⁸⁴ Barbas, C. F. III ; Wang, Y.-F. ; Wong, C. -H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2013.
- ⁸⁵ Machajewski, T. D. ; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352.
- ⁸⁶ Horecker, B. L. ; Tsolas, O. ; Lai, C. -Y. *The enzymes* ; Boyer, P. D. Ed. ; Academic Press : New York, **1975**, Vol. III, p 213.
- ⁸⁷ (a) Crow, V. L. ; Thomas, T. D. *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 600. (b) van, Rooijen, R. J. ; van Schalkwijk, S. ; De Vos, W. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7176.
- ⁸⁸ Gijzen, H. J. M. ; Qiao, L. ; Fitz, W. ; Wong, C. -H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443.
- ⁸⁹ (a) Lai, C. Y. ; Nakai, N. ; Chang, D. *Science* **1974**, *183*, 1204. (b) Lubini, D. G. E. ; Christen, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 2527. (c) Sygush, J. ; Beaudy, D. ; Allaire, M. ; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 7846. (d) Lees, W. J. ; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1887.
- ⁹⁰ Lorentzen, E. ; Siebers, B. ; Hensel, R. ; Pohl, E. *Biochemistry.* **2005**, *44*, 4222.
- ⁹¹ Jung S.-H. ; Jeong J.-H. ; Miller P. ; Wong C. H. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7182.
- ⁹² Gefflaut, T. ; Lemaire, M. ; Valentin, M.-L. ; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5920.
- ⁹³ Meyer, O. ; Rohmer, M. ; Grosdemange-Biallard, C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7921.
- ⁹⁴ Meyer, O. ; Ponaire, S. ; Rohmer, M. ; Grosdemange-Biallard, C. *Org. Lett.* **2006**, *19*, 4347.
- ⁹⁵ Wong, C. H. ; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3199.
- ⁹⁶ Itoh, N. ; Tujibata, Y. ; Liu, J. Q. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 193.
- ⁹⁷ Herk, v. T. ; Hartog, A. F. ; Schoemaker, H. E. ; Wever, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6244.
- ⁹⁸ Schoevaart, R. ; van Rantwijk, F. ; Sheldon, R. A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6940.
- ⁹⁹ Hettwer, J. ; Oldenburg, H. ; Flaschel, E. *J. Mol. Catal. B.* **2000**, *19*, 215.
- ¹⁰⁰ Streitenberger, S. A. ; Villaverde, M. J. ; Sánchez-Ferrer, Á. ; Garcia-Carmona, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 73.
- ¹⁰¹ Valentin M.-L. ; Bolte J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, *132*, 1167.
- ¹⁰² Charmantray, F. ; Dellis, P. ; Samerth, S. ; Hecquet, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3261.
- ¹⁰³ Wong, C.-H. ; shen, G.-L. ; Pederson, R. L. ; Wang, Y.-F. ; Hennen, W. J. *Meth. Enzymol.* **1991**, *202*, 591.
- ¹⁰⁴ (a) Varas, F. M. ; Qian, X. H. ; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7647. (b) Takawama, S. ; Martin, R. ; Wu, J. ; Laslo, K. ; Suizdak, G. ; Wong, C. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8146. (c) Remero, A. ; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8264.
- ¹⁰⁵ Chou, W. C. ; Chen, L. ; Fang, J. M. ; Wong, C. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6191.
- ¹⁰⁶ Liu, K. K. C. ; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4789.
- ¹⁰⁷ Chênevert, R. ; Dasser, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4529.

- ¹⁰⁸ Crestia, D. ; Thèse de l'université Blaise Pascal, n° 321, **2001**.
- ¹⁰⁹ Chou, W.-C. ; Fostch, C.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2916.
- ¹¹⁰ (a) Rosini G. ; Ballini R. *Synthesis* **1988**, 833. (b) Tamura R. ; Kamimura A. ; Ono N. *Synthesis* **1990**, 423.
- ¹¹¹ Mitchell, M. L. ; Lee, L. V. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5691.
- ¹¹² Liu, J. ; Shikhman, A. R. ; Lotz, M. K. ; Wong, C.-H. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 701.
- ¹¹³ Espelt, L. ; Parella, T. ; Bujons, J. ; Solans, C. ; Joglar, J. ; Delgado, A. ; Clapés, P. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4887.
- ¹¹⁴ Crestia, D. ; Demuynck, C. ; Bolte, J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2417.
- ¹¹⁵ Cesarotti E. ; Antognazza P. ; Pallavicini M. ; Villa L. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2344.
- ¹¹⁶ Burchardt A. ; Takahashi T. ; Takeuchi Y. ; Haufe G. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2078.
- ¹¹⁷ Charmantray, F. ; El Blidi, L. ; Gefflaut, T. ; Hecquet, L. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2951.
- ¹¹⁸ Chen, C.-S. ; Fujimoto, Y. ; Girdaukas, G. ; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1294.
- ¹¹⁹ (a) Kimura, R.; Nagano, T.; Kinoshita, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 2517–2525; (b) Shechter, H.; Ley, D. L.; Zeldin, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3664–3668; (c) Knefeli, F.; Mayer, K. K.; Poettinger, T.; Stoeber, G.; Wiegrebe, W. *Archiv. Pharm.* **1983**, *316*, 773–781.
- ¹²⁰ Hoaglin R. I. ; Kubler D. G. ; Montagna A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5460.
- ¹²¹ Trost, B. M. ; Dumas, J. ; Villa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9836.
- ¹²² Kobori, Y. ; Myles, D. C. Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899.
- ¹²³ Bornscheuer, U.T.; Kaslauskas, R. J.; *Hydrolases in Organic Synthesis* **1999**, VCH: Weinheim.
- ¹²⁴ Chênevert, R. ; Gravi, S. ; Bolte, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2081.
- ¹²⁵ (a) Henry, L. C. R. *Acad. Sci. Ser. C.* **1895**, *120*, 1265 ; (b) Luzzio, F. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 915.
- ¹²⁶ Jiang, T. ; Gao, H. ; Han, B. ; Zhao, G. ; Chang, Y. ; Wu, W. ; Gao, L. ; Yang, G. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2699.
- ¹²⁷ Ballini, R. ; Fiorini, D. ; Victoria, M, G. ; Palmieri, A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2799.
- ¹²⁸ Wang, Z. ; Xue, H. ; Wang, S. ; Yuan, C. *Chemistry and Biodiversity.* **2005**, *2*, 1195.
- ¹²⁹ (a) Trost, B. M. ; Yeh, V. S. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 861. (b) Evans, D. A. ; Seidel, D. ; Rueping, M. ; Lam, H. W. ; Shaw, J. T. ; Downey, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12692.
- ¹³⁰ Sasai, H. ; Tokunaga, T. ; Watanbe, S. ; Suzuki, T. ; Itoh, N. ; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7388.

- ¹³¹ Soengas, R. G. ; Estévez, J. C. ; Estévez, R. J. *Org. Lett.* **2003**, 5, 4457.
- ¹³² Luzzio, F. A. ; Fitch, R. W. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5493.
- ¹³³ Lucet, D. ; Sabelle, S. ; Kostelitz, O. ; Le Gall, T.; Mioskowski, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2583.
- ¹³⁴ Sorgedragar, M. J. ; Malpique, R. ; Rantwijk, v. F. ; Shedon, R. A. *Tetrahedron: asymmetry* **2004**, 15, 1295.
- ¹³⁵ El Blidi, L. ; Ahbala, M. ; Bolte, J. Lemaire, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 2684.
- ¹³⁶ Muratake, H.; Natsume, M.; Nakai, H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 11783.
- ¹³⁷ El Blidi, L. ; Crestia, D. ; Gallienne, E. ; Demuynck, C. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2951.
- ¹³⁸ Gallienne, E. Thèse de l'université Blaise Pascal, n° 1560, **2005**.
- ¹³⁹ (a) Lohse, A. ; Hardlei, T. ; Jensen, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *Biochem. J.* **2000**, 349, 211. (b) Bülow, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8567. (c) Bülow, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1545, 207. (d) Bülow, A. ; Plesner, I. W. ; Bols, M. *Anal. Biochem.* **2001**, 295, 186.
- ¹⁴⁰ Gallienne, E. ; Gefflaut, T. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 894.
- ¹⁴¹ Yoshikawa, M. ; Cha, B. C. ; Okaichi, Y. ; Takinami, Y. ; Yokokawa, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4236.

ANNEXES

I. Dosages enzymatiques

I.1. Dosage du DHAP

Dans une cuve de mesure du spectromètre on introduit :

- 20 μL d'une solution de NADH (10 mg/mL)
- 2U de α -GPDH (10 μL d'une solution de α -GPDH diluée 10 fois)
- 960 μL de tampon triéthanolamine pH 7,5 (0,1 M).

Nous effectuons une lecture de densité optique à 340 nm. La valeur trouvée est notée DO_i .

Nous ajoutons alors la solution de DHAP à doser, la valeur trouvée est notée DO_f .

La concentration de DHAP est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{DHAP}](\text{M}) = \frac{D_0 \times \text{volume cuve (mL)}}{\epsilon_{\text{NADH}} \times \text{volume prise d'essai (mL)}}$$

$$D_0 = \text{DO}_i - \text{DO}_f$$

Elle exprimée en mol/L. La valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ_{NADH} est de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

On effectue des prélèvements au cours du temps et à chaque fois on mesure la concentration en DHAP.

I.2. Dosage de l'activité enzymatique de l'aldolase

On introduit dans une cuve de spectromètre 1 mL de tampon triéthanolamine-HCl (0,1 M, pH = 7,5), 30 μL de fructose 1,6-bisphosphate (30 mg/mL), 20 μL de NADH (10 mg/mL), 10 μL (soit 2 U de GPDH) de GPDH-TPI (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) et 12,5 μL de la solution d'aldolase à doser (soit environ 0,02 U).

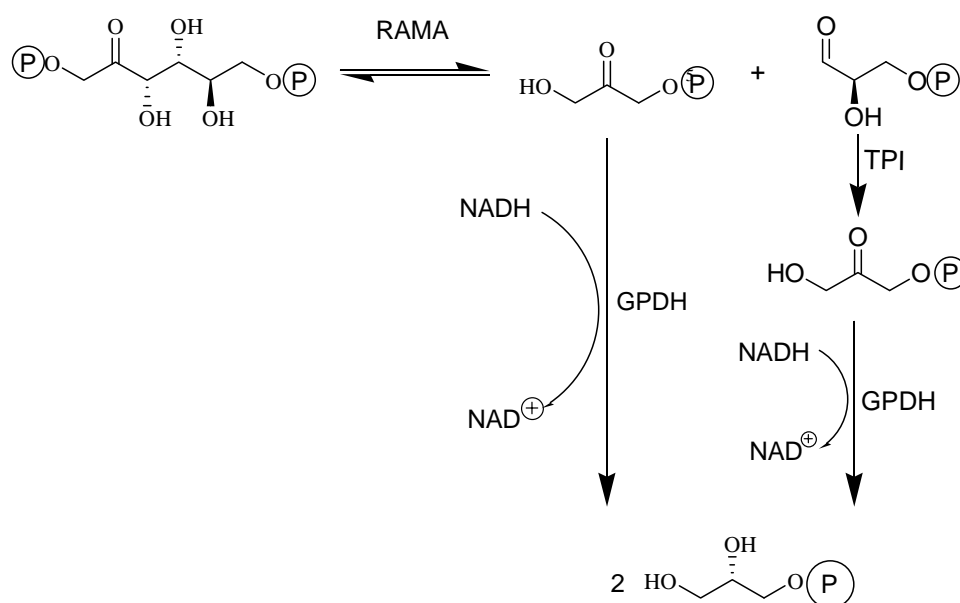


Schéma 110

La densité optique de l'échantillon est mesurée à 340 nm et est enregistrée pendant quelques minutes. On détermine la pente $\Delta D_o / \Delta t$ (min) qui représente l'évolution de la densité optique en fonction du temps et on calcule l'activité par mL en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Activité (U/mL)} = \frac{\Delta DO \times \text{vol}_{\text{cuve}}}{\Delta t \times \epsilon_{\text{NADH}} \times \text{vol}_{\text{RAMA}}} \times 10^3$$

(U en $\mu\text{mol/mL}$, 10^3 est un facteur correctif de conversion M/L en $\mu\text{mol/mL}$)

I.3. Détermination des constantes cinétiques des différents aldéhydes avec la RAMA

Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL on introduit l'aldéhyde étudié à différentes concentrations (20 à 50 mM), 7 μmol de DHAP, 1U de fructose-1,6-bisphosphate aldolase et la quantité de TEA (0,1 M pH 7,5) nécessaire pour obtenir un volume égal à 1 mL. A $t = 0$ et à $t = 15$ minutes, 10 μL de cette solution sont prélevés. Ces 10 μL sont additionnées dans une cuve de mesure du spectrophotomètre dans laquelle a été précédemment introduit :

- 20 μL d'une solution de NADH (10 mg/mL)
- 2U de α -GPDH (10 μL d'une solution de α -GPDH diluée 10 fois)
- 960 μL de tampon triéthanolamine

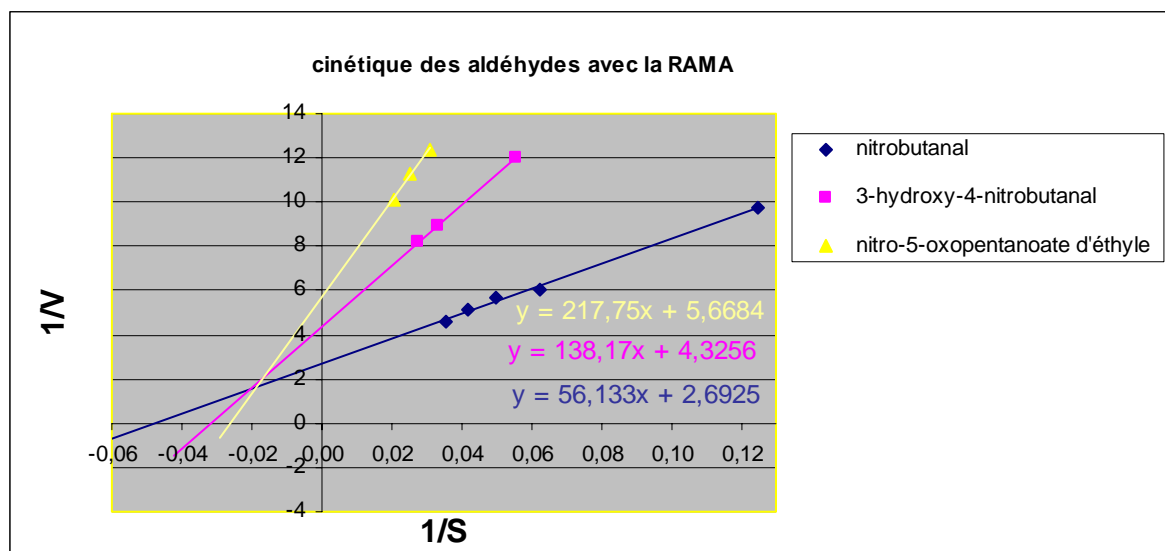
Les densités optiques des deux cuves correspondant aux prélèvements effectués à $t = 0$ et à $t = 15$ min sont enregistrées à 340 nm. La vitesse de disparition de l'aldéhyde ($V = \text{U/mL}$) est obtenue par l'équation suivante :

$$V = \frac{[\Delta(DO)_{t=0} - \Delta(DO)_{t=15}] \times \text{Vol}_{\text{cuve}}}{\text{Vol}_{\text{aldéhyde}} \times \epsilon_{\text{NADH}}}$$

Où V est exprimée en μmol de substrat disparu/min/mL. La valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ_{NADH} est de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Un dosage identique est réalisé pour différentes concentrations d'aldéhyde. La droite dont l'équation apparaît dessous est tracée en utilisant la représentation graphique de Lineweaver-Burk.

$$1/V = f(1/[\text{aldéhyde}])$$



Le point où la droite coupe l'axe des abscisses correspond à $-1/K_m$. Le point où la droite coupe l'axe des ordonnées correspond à $1/V_{\max}$. Ainsi nous déterminons graphiquement les constantes cinétiques (V_{\max} , K_m). (Tableau 16).

Substrats testés	K_m (mM)	V_{\max} (en %)
D-G-3-P	1	100
193	21	37
222	32	23
rac-217	38	18

Tableau 16

II. Evaluation des propriétés inhibitrices

II.1. Généralités

L'ensemble des mesures a été réalisé sur un spectrophotomètre HITACHI U-2010, équipé d'un passeur thermorégulé, dans des cuves en polystyrène à usage unique.

Les expériences ont été réalisées à 25°C dans un tampon phosphate 25 mM à pH 6,8 (3,4 g de KH_2PO_4 ; KOH 1N ; qsp 1L d'eau) sur un volume total de 1 mL. Les variations de densité optique des solutions ont été suivies à 400 nm pendant cinq minutes, excepté pour l' α -glucosidase de riz, pour laquelle vingt minutes de mesure sont nécessaires.

Les enzymes utilisées sont commercialisées par la société Sigma :

- α -glucosidase de levure de boulanger ; solide ; activité spécifique : $7,6 \text{ U.mg}^{-1}$
- β -glucosidase d'amandes ; solide ; activité spécifique : $12,4 \text{ U.mg}^{-1}$
- α -galactosidase de grains de café vert ; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium ($5,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; activité spécifique : $11,6 \text{ U.mg}^{-1}$
- β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* ; solide ; activité spécifique : $11,7 \text{ U.mg}^{-1}$
- α -mannosidase de pois sabre (Jack beans) ; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium ($5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; activité spécifique : 19 U.mg^{-1}

Les substrats des glycosidases (*p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophényl- α -D-galactopyranoside, *o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, *p*-nitrophényl- α -D-mannopyranoside) sont également commercialisés par la société Sigma.

II.2. Détermination des constantes de Michaelis

Un volume de solution enzymatique est additionné à la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les concentrations indiquées dans le tableau suivant (**Tableau 17**).

Enzymes	Concentration enzymatique dans la cuve (U.mL ⁻¹)
α -glucosidase (levure de boulanger)	0,152
β -glucosidase (amandes)	0,273
α -galactosidase (grains de café vert)	0,018
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	1,638
α -mannosidase (pois sabre)	0,073

Tableau 17

Après cinq minutes d'incubation, une quantité variable de substrat est additionnée (**Tableau 18**) et la variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie. La pente de la droite obtenue ($\Delta DO/\Delta t$) permet de calculer la vitesse de la réaction enzymatique ($\varepsilon = 18 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Enzymes	Concentration en substrat dans la cuve (mM)
α -glucosidase (levure de boulanger)	0,04 à 0,2
β -glucosidase (amandes)	0,25 à 2,5
α -galactosidase (grains de café vert)	0,2 à 1
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	0,25 à 2
α -mannosidase (pois sabre)	0,31 à 1,83

Tableau 18

La représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer les constantes de Michaelis de chaque glycosidase.

II.3. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur

Un volume de solution enzymatique est incubé en présence d'une concentration de 1 mM en inhibiteur dans la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les concentrations indiquées dans le tableau suivant (**Tableau 19**).

Enzymes	Concentration enzymatique dans la cuve (U.mL ⁻¹)
α -glucosidase (levure de boulanger)	0,076
β -glucosidase (amandes)	0,136
α -galactosidase (grains de café vert)	0,018
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	1,638
α -mannosidase (pois sabre)	0,073

Tableau 19

Une quantité de substrat est additionnée de façon à atteindre une concentration égale au K_m , après cinq et trente minutes d'incubation, pour vérifier la réversibilité de l'inhibition. La variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie et la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur est calculée.

Parallèlement à chacune de ces mesures, des mesures sont effectuées à cinq et trente minutes d'incubation sans inhibiteur. Le quotient de la vitesse obtenue en présence d'inhibiteur sur la vitesse obtenue en absence d'inhibiteur donne le pourcentage d'activité restante de l'enzyme.

En utilisant la relation suivante, le pourcentage d'activité restante permet d'estimer la valeur de la constante d'inhibition.

$$K_i = \frac{[I]}{\left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right)\left(\frac{100}{\%AR} - 1\right)}$$

II.4. Détermination des constantes d'inhibition

II.4.1. Détermination précise

Un volume de solution enzymatique est incubé en présence de différentes concentrations en inhibiteur encadrant le K_i estimé, dans la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les mêmes concentrations enzymatiques que pour la détermination des K_m ().

Après cinq minutes d'incubation, une quantité variable de substrat est additionnée (**Tableau 18**). La variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie et la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur est calculée.

Pour chaque concentration en inhibiteur, la représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer les constantes de Michaelis apparentes. Le tracé de ces constantes en fonction de la concentration en inhibiteur permet de déterminer précisément les constantes d'inhibition.

II.4.2. Détermination rapide

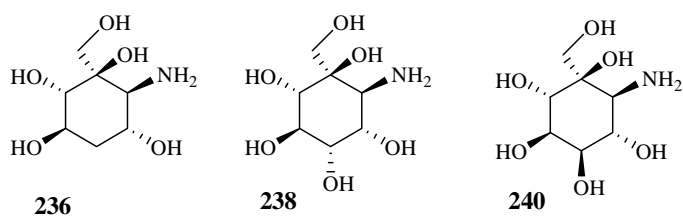
Un volume de solution enzymatique est incubé en présence d'une concentration de 1 mM en inhibiteur dans la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les mêmes concentrations enzymatiques que pour la détermination des K_m .

Après cinq minutes d'incubation, une quantité variable de substrat est additionnée (**Tableau 18**). La variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie et la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur est calculée.

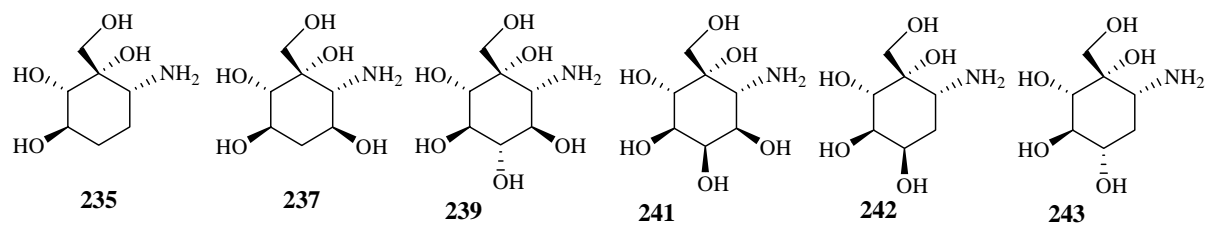
La représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer la constante de Michaelis apparente correspondant à la concentration de 1 mM en inhibiteur.

La relation suivante permet de déterminer plus rapidement qu'avec la méthode précédente la valeur de la constante d'inhibition.

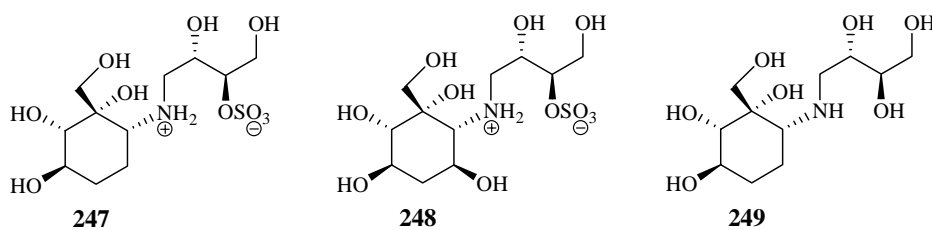
$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K'_m}{K_m} - 1}$$



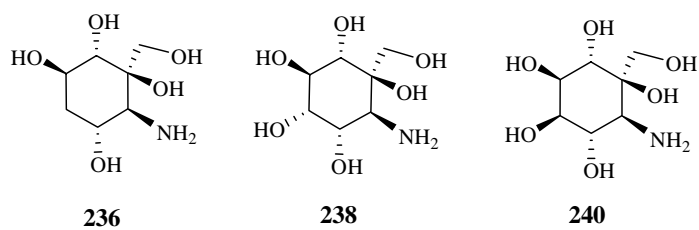
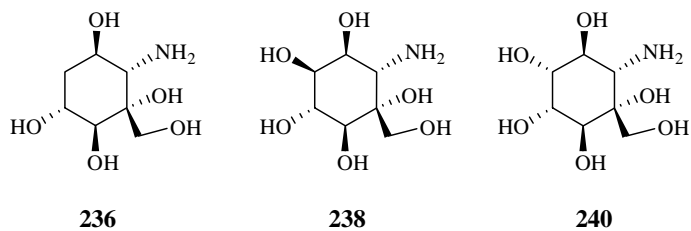
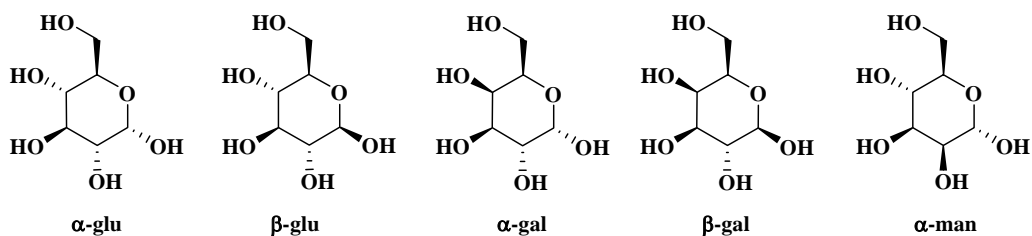
Famille 1

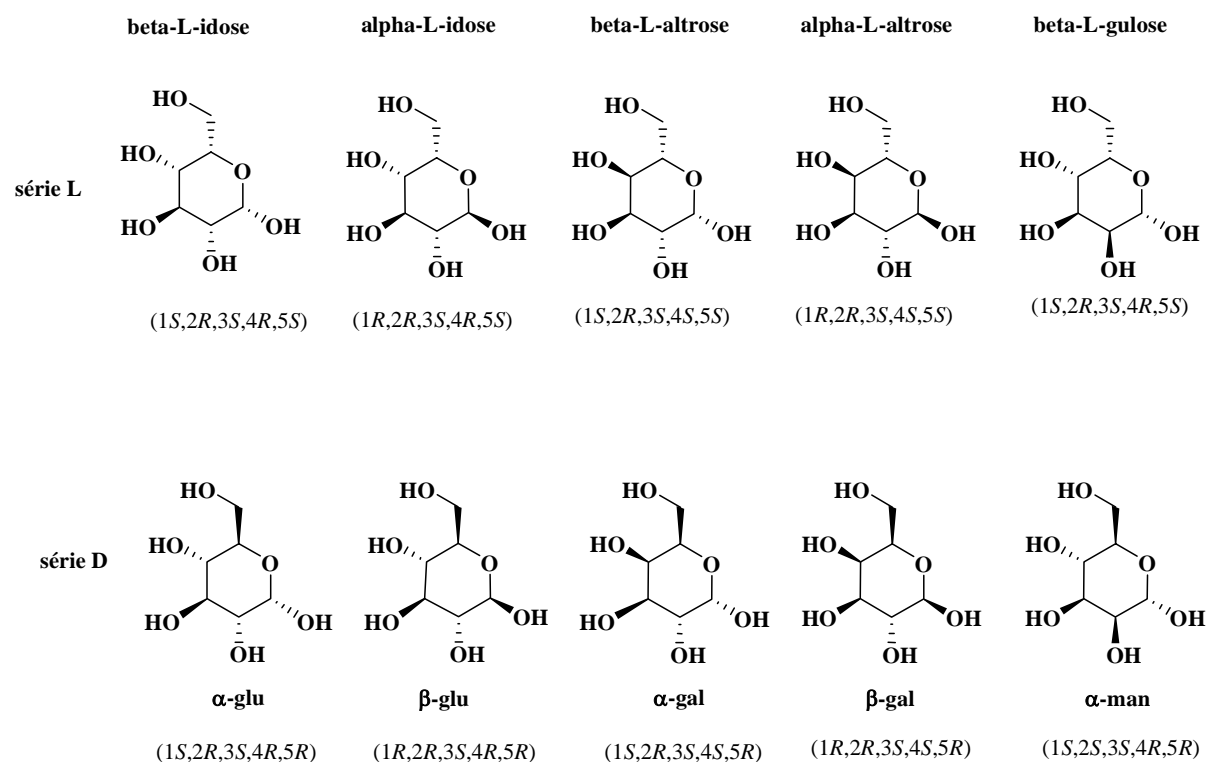


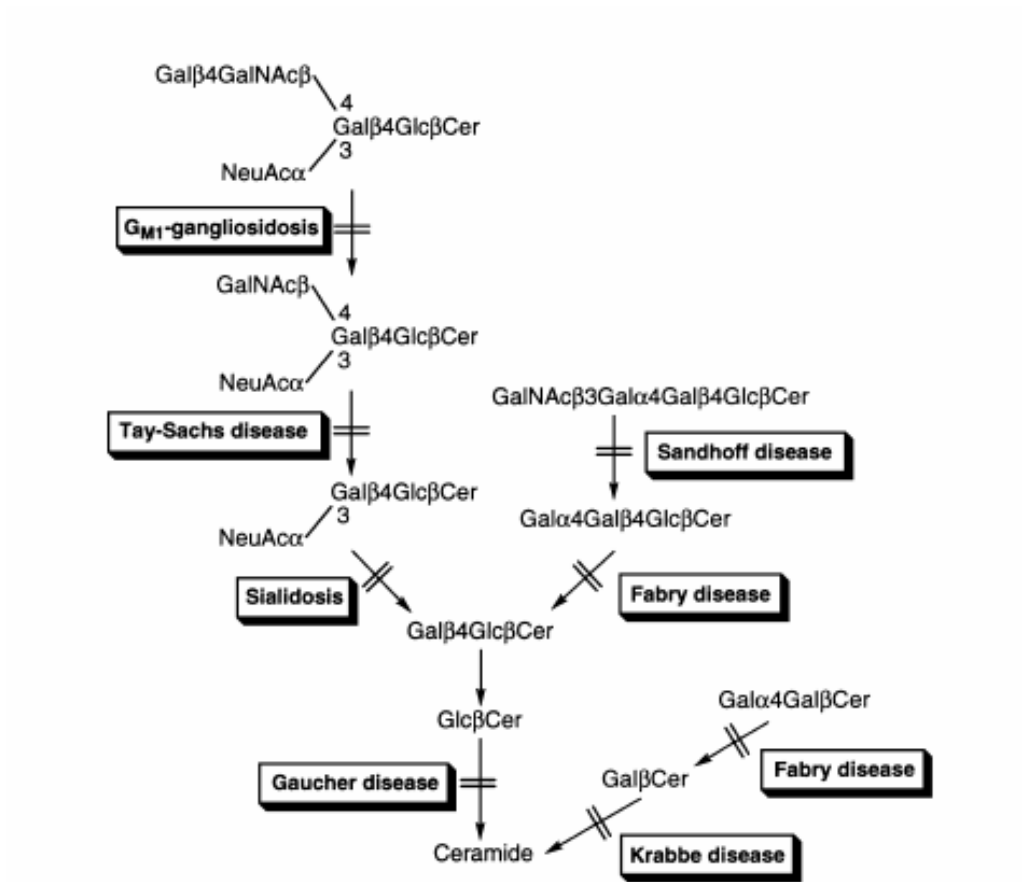
Famille 2



Famille 3







Dégradations des glycosphingolipides (GSLs) dans les lysosomes des cellules
 Les noms des maladies héréditaires sont encadrés
 Cer = céramide, GalNAc = *N*-acétylgalactosamine

RESUME

Les glycosidases sont des enzymes impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Leurs inhibiteurs présentent un potentiel thérapeutique en tant qu'agents antidiabétiques, agents antiviraux ou agents pour traiter des maladies génétiques.

Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à développer une voie de synthèse chimioenzymatique permettant d'accéder à des analogues de la valioline, puissant inhibiteur d' α -glucosidases. Les aminocyclitols que nous avons pour objectif de préparer diffèrent de la valioline par la position du groupement amino et des stéréochimies des hydroxyles.

Nous avons synthétisé ces aminocyclitols selon une méthode originale, basée sur un procédé en un seul pot mettant en jeu deux enzymes et trois réactions : une aldolisation catalysée par la fructose-1,6-bisphosphate aldolase, une déphosphorylation catalysée par une phytase et une nitroaldolisation intramoléculaire. Ainsi deux liaisons C-C sont formées de façon hautement stéréosélective en une seule étape. Nous avons synthétisé neuf nouveaux aminocyclitols et deux nouveaux zwitterions et un dérivé N-alkylé. Quelques aminocyclitols se sont révélés des inhibiteurs sélectifs de la β -glucosidase d'amandes douces et de la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae*.

Mots-clés : aminocyclitols, zwitterions, inhibiteurs de glycosidases, valioline, aldolase, dihydroxyacétonephosphate, synthèse chimioenzymatique, nitroaldolisation, constantes d'inhibition.

ABSTRACT

Glycosidases are enzymes involved in many biological processes. In consequence, their inhibitors have many potential applications such as antidiabetic, antiviral drugs and are also used for treating genetic diseases.

In the course of this work, we developed a chemoenzymatic process, to give access to analogues of valioline, a potent α -glucosidase inhibitor. Our aim was to prepare aminocyclitols bearing the amino group at a different position than the one found in valioline and with hydroxyl groups of various stereochemistries.

Therefore we prepared the aminocyclitols using an original method based on an one-pot process involving two enzymes and three reactions : aldolization catalyzed by the fructose-1,6-bisphosphate aldolase, dephosphorylation catalyzed by phytase and intramolecular nitroaldolization. Two C-C bonds were formed with a high stereoselectivity. In consequence, nine new aminocyclitols and two new zwitterions and one N-alkyl derivative were synthesized. Some aminocyclitols have shown a selectivity towards sweet almond β -glucosidase and *Aspergillus oryzae* β -galactosidase.

Key words : aminocyclitols, zwitterions, glycosidases inhibitors, valioline, aldolase, dihydroxyacetonephosphate, chemoenzymatic synthesis, nitroaldolization, inhibition studies